

УДК 616.36-002-036.12-071-097.3

ПРИТУЛИНА Ю.Г., КРИВОРУЧКО И.В., ШЕНЦОВА В.В., ФИЛЬ Г.В., АСТАПЧЕНКО Д.С., САХАРОВА Л.А.
Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко Минздрава России

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АНАЛИЗА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ РЯДЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Резюме. В последние годы открытие цитокинов и изучение их роли в патогенезе широкого круга заболеваний определили приоритеты их исследования при различной патологии, в том числе при инфекционных заболеваниях. В данной статье приводится анализ изучения цитокинового статуса различных биологических жидкостей и динамики его показателей при ряде инфекционных заболеваний. Цитокиновый профиль позволяет оценить характер течения инфекционного процесса, прогнозировать исход заболевания и оценить эффективность терапии. Данная работа проведена на кафедре инфекционных болезней ВГМА им. Н.Н. Бурденко с целью изучения динамики показателей цитокинового профиля в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов у больных хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом С, исследования местного цитокинового статуса носоглоточного секрета и слюны у пациентов с гриппом, а также анализа уровня цитокинов в буллезном экссудате у больных с рецидивирующей розей. В исследование включены 268 человек, которые были разделены на четыре группы.

Ключевые слова: цитокиновый статус, хронический вирусный гепатит, роза, грипп.

Введение

В последние годы открытие цитокинов и изучение их роли в патогенезе широкого круга заболеваний определили приоритеты их исследования при различной патологии, в том числе при инфекционных заболеваниях. В клинической практике исследование цитокинового статуса позволяет оценить характер течения процесса и прогнозировать исход заболевания при многих инфекциях, объективно оценить эффективность терапии, особенно в случаях применения иммуномодулирующих и иммунокорректирующих средств. Цитокины также отражают индивидуальную первичную реакцию на этиотропный агент [2, 3, 5].

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма, они вовлечены фактически в каждое звено иммунитета [4, 5, 7]. Для цитокинов характерен сложный сетевой характер функционирования, при котором продукция одного из них влияет на образование или проявление активности ряда других. В связи с этими особенностями биосинтеза и регуляции цитокинов они не всегда определяются в циркулирующей крови.

Диагностическая значимость оценки уровня цитокинов заключается в констатации самого факта его повышения или понижения у данного больного с конкретным заболеванием, причем для оценки тяжести и прогнозирования течения заболевания целесообразно определять концентрацию как про-, так и противовоспалительных цитокинов в динамике развития патологии.

Кроме исследования содержания цитокинов в сыворотке крови и других биологических жидкостях

(слюна, моча, бронхоальвеолярная жидкость, конденсат выдыхаемого воздуха, жидкость пародонтального кармана, слезная и стекловидная жидкость, синовиальная жидкость и др.), дополнительную информацию получают при изучении способности клеток к продукции цитокинов.

Среди воспалительных цитокинов важнейшее значение имеют фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), интерлейкин-1 (ИЛ-1), -6, -8 и ИЛ-12, которым «противостоят» противовоспалительные цитокины — ИЛ-4, -10, -11, -13. Лекарственные средства, направленные на подавление провоспалительных цитокинов, теоретически должны восстанавливать баланс между про- и противовоспалительными цитокинами [7, 8].

К настоящему времени накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о наличии тесного взаимодействия между уровнем содержания цитокинов в сыворотке крови и другими биологических жидкостях и клиническими характеристиками инфекционного процесса. В связи с этим постоянно расширяется диапазон инфекционной патологии, при котором изучается уровень и динамика цитокинов методом иммуноферментного анализа (ИФА) или биотестов [1, 4, 6]. Исследование цитокинового статуса позволит определить характер течения инфекционного процесса, прогнозировать исход заболевания и оценить эффективность терапии.

© Притулина Ю.Г., Криворучко И.В., Шенцова В.В., Филь Г.В., Астапченко Д.С., Сахарова Л.А., 2014

© «Актуальная инфектология», 2014

© Заславский А.Ю., 2014

На кафедре инфекционных болезней ВГМА им. Н.Н. Бурденко проведены исследования по изучению цитокинового статуса и динамики его показателей при ряде инфекционных заболеваний.

Цель исследования: изучение динамики показателей цитокинового профиля в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов у больных хроническим гепатитом В (ХГВ), хроническим гепатитом С (ХГС); исследование местного цитокинового статуса носоглоточного секрета и слюны у пациентов с гриппом; анализ уровня цитокинов в буллезном экссудате у больных рецидивирующей рожей.

Материалы и методы

В исследование включены 268 человек, которые были разделены на четыре группы. Первую группу (17 чел.) составили пациенты с диагнозом «хронический вирусный гепатит В средней тяжести» — 12 мужчин и 5 женщин в возрасте от 25 до 63 лет.

Вторую группу (25 чел.) — пациенты с диагнозом «хронический вирусный гепатит С средней тяжести»: 18 мужчин и 7 женщин в возрасте от 19 до 58 лет.

В третью группу включены 132 человека — 89 мужчин и 43 женщины с диагнозом «грипп А (H1N1) sw1», возраст обследуемых варьировал от 18 до 65 лет.

В четвертую группу вошли 94 пациента в возрасте от 48 до 64 лет (59 женщин и 35 мужчин) с диагнозом «рецидивирующая рожа, эритематозно-буллезная форма, среднетяжелое течение».

Контрольную группу составили 89 пациентов (60 женщин и 29 мужчин).

Пациентам первой группы с диагнозом ХВГВ проводилось лечение телбивудином (себиво) 600 мг в сутки в течение 60 недель. До момента обследования больные не получали противовирусной терапии.

Во второй группе пациентов с диагнозом ХВГС средней тяжести проводили общепринятую базисную терапию, на фоне которой больные получали пегасис в сочетании с ребетолом (рибавирин) в терапевтических дозах в зависимости от массы тела в течение 12 недель (3 месяцев).

Всем больным проводилось исследование цитокинового профиля на системном (в сыворотке крови) и локальном (в супернатантах гепатобиоптатов) уровнях. С помощью ИФА определяли уровень провоспалительных цитокинов, таких как ФНО- α , ИЛ-2, и противовоспалительных — ИЛ-10, ИЛ-4. Для определения уровня цитокинов на локальном уровне использовались биоптаты, полученные после проведения пункционной биопсии печени.

Третья группа больных, пациенты с диагнозом «грипп А (H1N1) sw1», получали новую схему противовирусной терапии (H1N1) — комбинацию противовирусных средств — ингавирин внутрь по 90 мг (1 капсула) 1 раз в день (курс лечения — 5 дней) и эргоферон (таблетки для рассасывания). Эргоферон, включенный в комплексную схему, назначали по 2 таблетки 4 раза в день (в первый день), со второго по пятый дни — по 1 таблетке 3 раза в день. Для характеристики местного цитокинового статуса количественно определяли в слюне и носоглоточном секрете ФНО- α , интерферон- γ (ИНФ- γ), ИНФ- α , ИЛ-2 и ИЛ-10 методом ИФА.

Четвертая группа наблюдаемых пациентов с рецидивирующей рожей эритематозно-буллезной формы среднетяжелого течения была разделена на две подгруппы в зависимости от варианта проводимой терапии. Пациенты первой подгруппы (56 чел.) на фоне традиционного лечения получали озонированный физиологический раствор ежедневно в течение 5 дней в сочетании с низкоинтенсивной лазеротерапией воспалительного очага, магистрального сосудистого пучка и регионарных лимфатических узлов один раз в сутки, курс — 10 процедур.

Больным второй подгруппы — 38 человек — в дополнение к традиционной схеме назначалась внутривенная озонотерапия (инфузия озонированного физиологического раствора в течение 5 дней) в сочетании с иммуномодулятором суперлимф (ежедневные однократные аппликации на эрозивную поверхность вскрытой буллы в течение 2–3 дней).

Пациенты контрольной группы получали только традиционную терапию.

Всем пациентам с диагнозом «рецидивирующая рожа, эритематозно-буллезная форма» проводилось определение уровня цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-10) в буллезном экссудате до начала лечения и на фоне проводимой терапии. Концентрация цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-10) в содержимом булл определялась методом ИФА.

При анализе полученных результатов использовались описательные методы математической статистики с применением пакета программ Microsoft Excel 2010. В процессе обработки полученных результатов применялся также метод корреляционного анализа с выявлением прямых достоверных корреляционных связей и определения коэффициента корреляции (К). Достоверность различий оценивалась методами непараметрической статистики, критический уровень значимости (р) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение результатов

Динамика показателей цитокинового профиля в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов у больных ХГВ была следующей (рис. 1).

Значения цитокинов ФНО- α , ИЛ-10 и ИЛ-4 в сыворотке крови больных после 3 месяцев проведенного лечения снизились в 3,3–4,3 раза (в среднем в 3,8 раза), ИЛ-2 — повысились в 1,9–2,2 раза от исходного уровня (в среднем в 2,05 раза). Через 6 месяцев противовирусной терапии уровень данных показателей улучшился в 3,9–4,7 (в среднем в 4,3) и 2,0–2,7 раза (в среднем в 2,45 раза) соответственно. Через 9 месяцев терапии исследуемые показатели имели нормальные значения у 82,4 % больных. Уровень ФНО- α , ИЛ-10 и ИЛ-4 в супернатантах гепатобиоптатов после проведенного курса противовирусной терапии снизился в 2,8–3,7 раза от исходных значений (в среднем в 6,5 раза), напротив, концентрация ИЛ-2 повысилась в 2,6–3,8 раза (в среднем в 3,2 раза). Что касается базисной терапии, то уровень цитокинового профиля претерпевал положительные изменения только после 9 месяцев лечения.

Таким образом, дополнительным методом оценки эффективности противовирусной терапии больных ХГВ могут быть показатели, отражающие дисбаланс цитокинового профиля в сыворотке крови и биоптатах печени.

При изучении показателей цитокинового профиля в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов у больных ХГС на фоне проводимой противовирусной терапии получены следующие данные (рис. 2). Содержание цитокинов ФНО- α , ИЛ-10 и ИЛ-4 в сыворотке крови больных после проведенного лечения снизилось в 2,5–4 раза (в среднем в 3,25 раза), ИЛ-2 повысился в 1,5–2 раза от исходного уровня (в среднем в 1,75). Уровень ФНО- α , ИЛ-10 и ИЛ-4 в супернатантах гепатобиоптатов снизился в 3,5–4,5 раза от исходных значений (в среднем в 4 раза), а концентрация ИЛ-2 повысилась в 1,5–2 раза (в среднем в 1,75 раза). Что касается базисной терапии, то уровень цитокинового профиля претерпел такие же изменения только после 6 месяцев лечения.

Проведенные исследования демонстрируют, что дополнительным критерием эффективности противовирусной терапии больных ХГС является динамика уровней ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-4, ИЛ-2 в сыворотке крови и гепатобиоптатах печени.

При изучении цитокинового статуса носоглоточного секрета и слюны у пациентов с гриппом были установлены следующие показатели (табл. 1). В дебюте заболевания отмечена активация местных провоспалительных процессов в слизистой полости рта и носа, что демонстрируют высокие уровни ИЛ-2 в слюне ($1047,83 \pm 19,24$ пг/мл) и носоглоточном секрете ($1360,45 \pm 25,66$ пг/мл). В сыворотке крови при этом отмечается уровень провоспалительного ИЛ-2 $370,40 \pm 21,14$ пг/мл, что в 6,5 раза меньше по сравнению с концентрацией в секретах. Прямую корреляционную связь имеют с концентрацией противовоспалительного ИЛ-10 в слюне и крови ИЛ-2 и ИНФ- γ , т.е. локальное возрастание концентраций агрессивных провоспалительных факторов (ИЛ-2 и ИНФ- γ) при гриппе сопровождается системным увеличением противовоспалительных агентов. Также получена корреляция между содержанием ИЛ-10 и ИНФ- α в сыворотке крови и слюнной жидкости. Статистически значимые различия уровня ИНФ- α в слюне и носоглоточном секрете не выявлены. Автономный иммунный ответ показал корригирующее влияние этиотропной терапии.

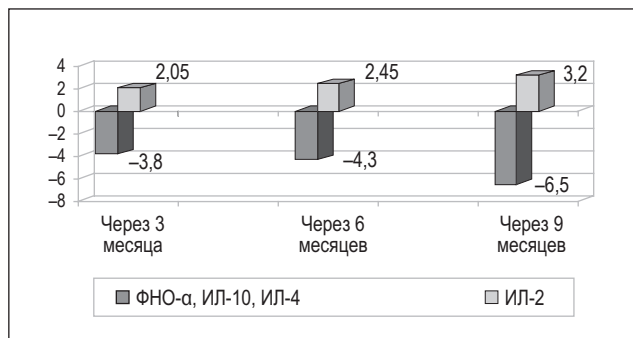


Рисунок 1. Динамика цитокинового профиля у больных хроническим гепатитом В (1-я группа)

Таким образом, учет динамики показателей про- и противовоспалительных профилей в слюне больных гриппом дает возможность характеризовать реакцию иммунной системы при данной патологии, прогнозировать течение заболевания, проводить адресную коррекцию лечения. Выбор слюны в качестве материала для исследования отличается неинвазивностью и простотой ее получения.

Результаты изучения динамики показателей цитокинового профиля буллезного экссудата у пациентов с рецидивирующей рожой на фоне лазеро- и озонотерапии были следующими (рис. 3).

На фоне традиционной терапии наблюдалось незначительное статистически недостоверное снижение исходного уровня концентрации провоспалительных цитокинов: ФНО- α — с $32,17 \pm 3,19$ пг/мл до $23,78 \pm 2,07$ пг/мл, ИЛ-1 β — с $129,48 \pm 13,64$ пг/мл до $109,56 \pm 12,34$ пг/мл и статистически недостоверное повышение ИЛ-10 с $77,13 \pm 16,37$ пг/мл до $98,32 \pm 16,31$ пг/мл ($p < 0,05$).

На фоне комбинированной терапии (озон + лазер) наблюдалось достоверное снижение концентрации провоспалительных цитокинов: ФНО- α — с $32,64 \pm 4,19$ пг/мл до $10,51 \pm 1,29$ пг/мл ($p < 0,05$), ИЛ-1 β — с $127,83 \pm 12,71$ пг/мл до $57,37 \pm 9,67$ пг/мл ($p < 0,05$) и достоверное повышение ИЛ-10 с $82,78 \pm 15,43$ пг/мл до $219,12 \pm 12,14$ пг/мл ($p < 0,05$).

В ходе проведенных исследований у больных с буллезными формами рожи впервые определена концентрация ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-10 в содержимом булл. Выявлено повышение уровня провоспалительных (ФНО- α , ИЛ-1 β) и противовоспалительных (ИЛ-10) цитокинов, что имеет прогностическое значение при оценке течения болезни и эффективности проводимой терапии.

При анализе уровней про- и противовоспалительных цитокинов в буллезном экссудате у пациентов с рецидивирующей буллезной рожой на фоне системной озонотерапии и применения иммуномодулятора суперлимф были получены следующие данные.

Впервые изучен количественный уровень провоспалительных (ИЛ-1 β , ФНО- α) цитокинов и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокина в буллезном экссудате. Показатели, иллюстрирующие влияние комбинации «озонотерапия + суперлимф» на цитокиновый спектр экссудата булл, в сравнении с традиционной терапией следующие.

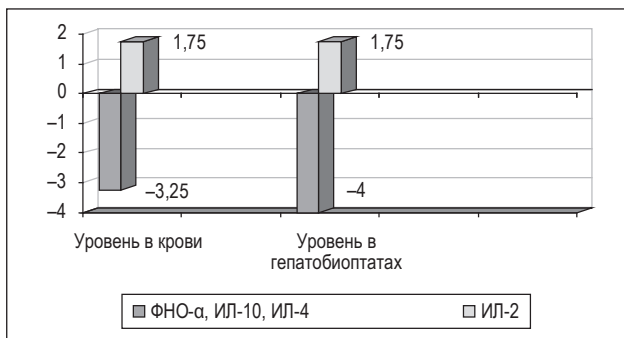


Рисунок 2. Динамика цитокинового профиля у больных хроническим гепатитом С (2-я группа)

На фоне комбинированной терапии с применением озона и суперлимфа отмечается более выраженная коррекция уровней изучаемых цитокинов по сравнению с традиционным лечением. Так, количество провоспалительных цитокинов значительно снизилось: ФНО- α — уменьшилось в 2,5 раза, ИЛ-1 β — в 4,5 раза. Противовоспалительный ИЛ-10 возрос в 2,9 раза по сравнению с традиционным лечением. У пациентов, которым проводилась традиционная терапия, содержание исследуемых цитокинов изменялось статистически значимо в позитивную сторону, однако количество ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-10 в буллах на фоне комбинированного лечения статистически достоверно ($p < 0,05$) более значимо отличается от уровня данных цитокинов на фоне традиционного лечения. Это свидетельствует о полноценной коррекции имеющегося дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов в буллах на фоне озонотерапии в сочетании с суперлимфом. Восстановление нарушенного баланса изучаемых цитокинов ведет к адекватной продукции ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-10, а значит, к быстрому ослаблению и стойкому купированию воспалительного процесса.

Таким образом, впервые в эксудате булл определен уровень ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-10 — до начала терапии выявлено повышение провоспалительных (ФНО- α , ИЛ-1 β) и снижение противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов.

Установлено, что динамика цитокинов в содержимом булл — снижение уровня ФНО- α , ИЛ-1 β и увеличение уровня ИЛ-10 — зависит от варианта проводимой терапии. Применение внутривенной озонотерапии в сочетании с суперлимфом более эффективно устраняет гиперпродукцию провоспалительных цитокинов и способствует увеличению противовоспалительного цитокина в буллезном эксудате.

Кафедрой инфекционных болезней Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко получены патенты: изобретение № 2007139186 (042892) от 22.10.2007 г. «Способ оценки эффективности коррекции воспалительного процесса на фоне лечения больных с буллезными формами рожи»; изобретение № 2007123220 (025284) от 20.06.2007 г. «Способ определения цитокинов в буллезном содержимом».

Таблица 1. Изучение цитокинового профиля у больных гриппом в дебюте заболевания (3-я группа)

ИЛ-2	Уровень, пг/мл
В крови	370,40 ± 21,14
В слюне	1047,83 ± 19,24
В носоглоточном секрете	1360,45 ± 25,66

Выводы

В ходе проведенных исследований на кафедре инфекционных болезней Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко было установлено следующее:

1. Практический аспект оценки цитокинового профиля в гепатобиоптатах и сыворотке крови у больных ХГС и ХГВ заключается в возможности предсказать неэффективность той или иной лечебной схемы, что позволит врачу провести коррекцию терапии.

2. У больных гриппом цитокиновый статус слюны (ИЛ-2 — 1047,83 ± 19,24 пг/мл) является одним из прогностических критериев течения гриппа, а также дает возможность характеризовать реакцию иммунной системы при данной патологии и проводить адресную коррекцию лечения.

3. У пациентов с рецидивирующей буллезной формой рожи динамика цитокинов в содержимом булл зависит от варианта лечения — при применении комбинированной терапии отмечается снижение уровня ФНО- α в 2,5 раза, ИЛ-1 β — в 4,5 раза и увеличение уровня ИЛ-10 в 2,9 раза. Уровень цитокинов в буллезном эксудате целесообразно изучать у пациентов с рецидивирующей буллезной формой рожи с целью подбора оптимальной лечебной схемы и избегания необоснованной «перегрузки» лекарственными препаратами.

Таким образом, изучение показателей цитокинового профиля в различных биологических субстратах улучшает диагностику заболевания, а также позволяет прогнозировать течение болезни. Целесообразно оценивать динамику показателей цитокинового профиля с целью определения эффективности проводимого лечения и снижая риска терапевтических неудач.

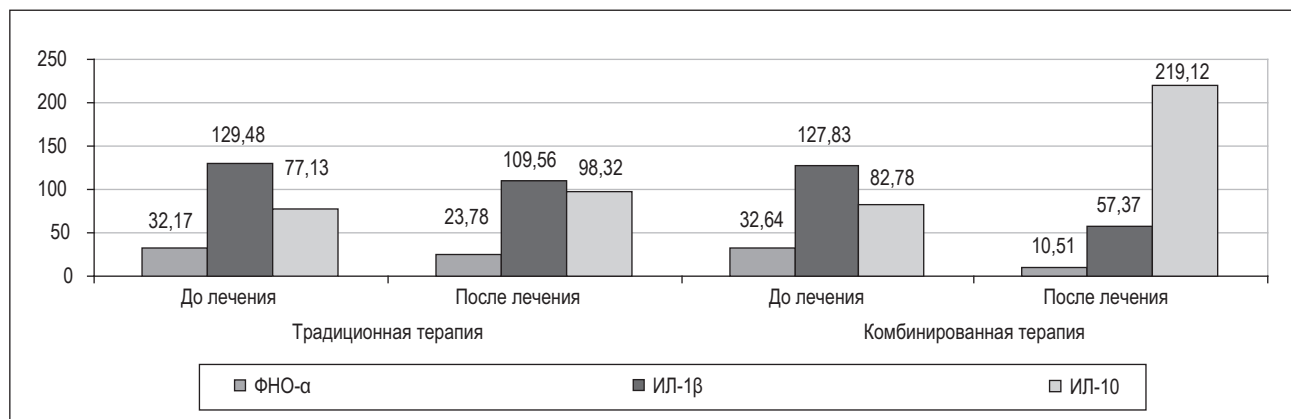


Рисунок 3. Динамика цитокинового статуса у больных с рецидивирующей рожей (4-я группа)

Список літератури

1. Иванов В.В. Исследование концентрации цитокинов, вырабатываемых Th2-лимфоцитами, у больных парагриппом / В.В. Иванов, М.В. Шпилов // Медицина: вызовы сегодняшнего дня: материалы междунар. науч. конф. (г. Челябинск, июнь 2012 г.). — Челябинск: Два комсомольца, 2012. — С. 39-41.
2. Кириллова Т.В. Показатели цитокинового профиля у больных лимфомами // БМИК. — 2013. — № 3. — С. 525.
3. Меркоданова Ю.А., Утц И.А. Цитокиновый профиль мочи при различных этиопатогенетических вариантах хронического пиелонефрита у детей // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2011. — № 4. — С. 901-904.
4. Нагоев Б.С., Нагоева М.Х., Камбачокова Э.А. О роли цитокинов в регуляции иммунной системы при инфекционных заболеваниях // Материалы III Ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням (Москва, 28–30 марта 2011 года) // Инфекционные болезни. — 2011. — Т. 9, прил. № 1. — С. 260.

5. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. — 2002. — № 1. — С. 9-17.

6. Хасанова Г. М. Взаимосвязь уровня циркулирующих цитокинов и микроэлементов у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2011. — № 4. — С. 863-865.

7. Belz G.T. Regulating inflammatory diseases. Life in the balance: killer T-cell self control fends off lethal influenza? // Immunology and Cell Biology. — 2009. — № 87. — P. 364-365.

8. Bermejo-Martin J.F., Garcia-Arevalo M.C., de Lejarazu R.O. et al. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children // Eur. Cytokine Netw. — 2007. — Vol. 18, № 3. — P. 162-167.

Получено 29.11.13 □

Притуліна Ю.Г., Криворучко І.В., Шенцова В.В., Філь Г.В., Астапченко Д.С., Сахарова Л.О.
Воронезька державна медична академія
імені М.М. Бурденка Міністерства
Здоров'я Росії

Pritulina Yu.G., Krivoruchko I.V., Shentsova V.V., Fil G.V., Astapchenko D.S., Sakharova L.A.
Voronezh State Medical Academy named
after N.N. Burdenko of Ministry of Healthcare of the Russian
Federation, Voronezh, Russia

ПРАКТИЧНА ЗНАЧУЩІСТЬ АНАЛІЗУ ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ ПРИ РЯДІ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Резюме. В останні роки відкриття цитокинів та вивчення їх ролі у патогенезі широкого кола захворювань визначили пріоритети їх дослідження при різній патології, в тому числі при інфекційних захворюваннях. У даній статті наводиться аналіз вивчення цитокинового статусу різних біологічних рідин і динаміки його показників при ряді інфекційних захворювань. Цитокиновий профіль дозволяє оцінити характер перебігу інфекційного процесу, прогнозувати результат захворювання та оцінити ефективність терапії. Ця робота проведена на кафедрі інфекційних хвороб ВДМА ім. М.М. Бурденка з метою вивчення динаміки показників цитокинового профілю в сироватці крові та супернатантах гепатобіоптатів у хворих на хронічний гепатит В і хронічний гепатит С, дослідження місцевого цитокинового статусу носоглоткового секрету та слини в пацієнтів із грипом, а також аналізу рівня цитокинів у бульозному ексудаті хворих на рецидивуючу бешиху. У дослідження включені 268 осіб, які були розподілені на чотири групи.

Ключові слова: цитокиновий статус, хронічний вірусний гепатит, бешиха, грип.

THE PRACTICAL SIGNIFICANCE OF CYTOKINE PROFILE ANALYSIS OF IN A NUMBER OF INFECTIOUS DISEASES

Summary. In recent years the discovery of cytokines and the study of their role in the pathogenesis of a wide range of diseases defined priorities of their research in various pathology, including infectious diseases. This article provides an analysis of the study of cytokine status of various biological liquids and dynamics of its indices in a number of infectious diseases. Cytokine profile enables to evaluate nature of the clinical course of infection processes, to predict the outcome of the disease and to evaluate the effectiveness of therapy. This study was carried out at the department of infectious diseases of VSMA named after N.N. Burdenko to study the dynamics of cytokine profile indicators in blood serum and supernatants of hepatobiopsates in patients with chronic hepatitis B and chronic hepatitis C, research of the local cytokine status of nasopharyngeal secretion and saliva from patients with influenza, as well as analysis of cytokine level in bullous exudate in patients with recurrent erysipelas. The study involved 268 people, who were divided into four groups.

Key words: cytokine status, chronic viral hepatitis, erysipelas, influenza.