



УДК 616.921.5-07-092-037

НЕКОТОРЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ГРИППЕ РН1N1

Ю.В. ИВАНОВ¹
М.В. ШИПИЛОВ²
В.В. ИВАНОВ³

¹⁾ Клиническая больница №83
Федерального медико-биологического агентства России,
г. Москва

²⁾ Смоленский государственный университет

³⁾ Консультативно-диагностическая поликлиника №1,
г. Смоленск

e-mail: med_infect@land.ru

Методом иммуноферментного анализа исследована концентрация в сыворотке крови 30 больных гриппом рН1N1 основных противовоспалительных цитокинов: рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1Ra), интерлейкина-4 (IL-4) и интерлейкина-10 (IL-10). Контролем служила кровь здоровых доноров (n=18). Определено повышение концентрации всех цитокинов в остром периоде среднетяжелой формы заболевания с последующим снижением (к периоду реконвалесценции) его уровня до нормы (IL-1Ra) или выше нормы (IL-4, IL-10). Особенностью тяжелого течения гриппа рН1N1 был более высокий уровень IL-1Ra и IL-10 при отсутствии IL-4 в системном кровотоке. Полученные результаты были использованы при создании экспертной системы "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ".

Ключевые слова: грипп рН1N1, рецепторный антагонист интерлейкина-1, интерлейкин-4, интерлейкин-10.

Введение. Противовоспалительные цитокины – цитокины, которые, даже в минимальных концентрациях, тормозят активность клеток, участвующих в воспалении, в результате чего происходит угнетение воспалительной реакции в целом [1, 7]. К противовоспалительным цитокинам относятся IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β . К тому же, противовоспалительными свойствами обладают антагонисты рецепторов провоспалительных цитокинов, растворимые рецепторы к цитокинам воспаления и антитела к провоспалительным цитокинам, блокирующие их эффекты. Антагонисты рецепторов провоспалительных цитокинов, среди которых наиболее изученным является антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra), структурно сходны с цитокинами воспаления, поэтому они связываются с соответствующими рецепторами, однако без активации воспалительной реакции. Также описаны обладающие сходным действием растворимые рецепторы к IL-1 (sIL-1R), IL-2 (sIL-2R), IL-6 (sIL-6R), TNF (sTNFR) и антитела к IL-1 и TNF [3, 7].

Из вышеперечисленных важнейшими противовоспалительными биологическими регуляторами являются IL-1Ra, IL-4 и IL-10. По структуре они представляют собой белки с молекулярной массой 15-36 кДа. IL-1Ra в острой фазе воспаления продуцируют преимущественно макрофаги и моноциты, а также нейтрофилы, фибробласты, гепатоциты, эндотелиальные клетки, дендритные клетки [8]. Механизм действия IL-1Ra заключается в блокаде клеточного рецептора, специфического для IL-1 α и IL-1 β ; тем самым происходит регуляция активности мощных цитокинов воспаления семейства IL-1 в месте внедрения и репликации вируса, в том числе и нежелательных их эффектов для организма при избыточной концентрации не только в месте воспаления, но и в системном кровотоке. Т.о. именно оптимальный баланс соотношения IL-1Ra и IL-1 обеспечивает адекватную реакцию организма в ответ на внедрение чужеродного агента, в том числе и вируса гриппа, а изменение этого баланса неизбежно приводит не только к нарушению функционирования цитокиновой сети, но и иммунной системы в целом [1, 3, 7].

IL-4 и IL-10 продуцируют преимущественно активированные Th2-лимфоциты, а также моноциты, макрофаги, В-лимфоциты, NK-клетки, кератиноциты, тучные клетки и др. под действием TNF- α , IFN- α , IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, IL-15 и других провоспалительных цитокинов [8]. Основная функция IL-4 и IL-10 состоит в изменении иммунного ответа с Th1 на Th2. IL-4 и IL-10 – мощные противовоспалительные и иммуносупрессивные факторы, ингибирующие избыточный синтез провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ,

IFN- γ , IFN- α активированными макрофагами и Th1-лимфоцитами, что приводит к ослаблению избыточного влияния медиаторов воспаления на организм человека и к одновременной активации гуморального ответа организма, выражающейся в прогрессивном повышении секреции Ig E и Ig G. В то же время, выработку противовоспалительных цитокинов ингибируют активированные липополисахаридом и IFN- γ моноциты [3, 7, 8].

В связи с тем, что в норме в организме человека существует баланс между активностью Th1- и Th2-лимфоцитов, в результате которого поддерживается гомеостаз между различными системами организма: иммунной, кроветворной, нервной, эндокринной и др. [3, 7] –, именно в дизрегуляции цитокиноопосредованных механизмов кооперации Т-лимфоцитов ряд исследователей видит причину утяжеления клинической картины различных заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы, особенно сопровождающихся неблагоприятным исходом [4, 7].

Таким образом, противовоспалительные цитокины (IL-1Ra, IL-4 и IL-10) в том числе "защищают" организм от избыточного воздействия мощных факторов воспаления, приводящих к повреждению тканей, а также от вероятности возникновения аутоиммунных реакций. Проведенные к настоящему времени исследования роли этих факторов при гриппе достаточно фрагментарны и нередко противоречат друг другу. Однако ряд учёных [11, 12] указывают на их исключительную важность в патогенезе гриппа А, особенно при тяжёлом течении, а также ведущую роль Th2-лимфоцитов в ограничении гиперреакции иммунокомпетентных клеток. Так, подчеркивая кардинальную роль в патогенезе птичьего гриппа вырабатываемого Th2-лимфоцитами мощного противовоспалительного цитокина IL-10, состоящую в подавлении чрезмерной активности иммунокомпетентных клеток преимущественно моноцитарно-макрофагального звена, часто приводящей к повышенной выработке мощных провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1, IL-6 с повреждением тканей, и необходимость ограничивающего действия со стороны Т-лимфоцитов, Belz G.T. [11] ввёл в заголовок своей статьи следующий риторический вопрос: "Жизнь в балансе: собственный контроль Т-киллеров предотвращает летальное течение гриппа?". Под «собственным контролем» Т-лимфоцитов автор подразумевает выработку ими IL-10; он предполагает, что высокий уровень IL-10 ограничивает непропорционально сильный иммунный ответ организма, характерный для патогенеза «птичьего» гриппа. По его мнению, искусственно вызванное повышение продукции IL-10 иммунокомпетентными клетками под действием селективных иммуностимуляторов либо теоретически возможное введение препарата, содержащего IL-10, приведёт к повышению выживаемости больных с тяжёлым течением птичьего гриппа, характеризующимся и в настоящее время чрезвычайно высокой летальностью (50-61%) [11].

Ряд исследований, проведенных у больных гриппом рН1N1, подтверждают предположение Belz G.T. В связи с тем, что при гриппе рН1N1 определено повышенное содержание мощных провоспалительных цитокинов, таких как IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-18 [10, 12, 13], ограничивающее действие противовоспалительных цитокинов является жизненно необходимым. Так, повышение уровня IL-1Ra и IL-10 в периферической крови было выявлено у больных как среднетяжёлым течением гриппа рН1N1, так и с тяжёлым течением заболевания с развитием острого респираторного дистресс-синдрома. У той же группы больных со среднетяжёлым течением гриппа рН1N1 не было отмечено статистически достоверных различий уровня IL-4 в периферической крови с контролем, однако было выявлено повышение его концентрации у больных тяжёлой формой заболевания с развитием острого респираторного дистресс-синдрома, в 85% случаев закончившегося благоприятно [12].

Однако проведенные исследования на лабораторных животных показали несколько другие результаты. Так, при инфицировании массивной дозой вируса гриппа А мышей, у которых выработка IL-10 производится изначально на низком уровне вследствие генетического дефекта ("IL-10 дефицитная" линия), их летальность оказалась ниже, чем у мышей, у которых продукция IL-10 не была генетически нарушена. Данный эффект авторы связывают с тем, что хотя IL-10 и ограничивает воспалительную реакцию, но его избыточное количество *in vivo* тормозит активацию



Th17-лимфоцитов, что приводит к недостаточной выработке ими ИЛ-17, защищающего животных от развития летальной пневмонии [14].

В связи с противоречивостью данных, полученных в эксперименте и при исследовании больных гриппом рН1N1, **целью настоящей работы** явилось исследование уровня основных противовоспалительных медиаторов (ИЛ-1Ra, ИЛ-4, ИЛ-10) в крови больных гриппом рН1N1 с объяснением их возможной прогностической роли.

Материалы и методы исследования. Под нашим наблюдением находилось 20 больных гриппом в форме средней тяжести в возрасте 15-54 лет с благоприятным и неосложнённым течением заболевания. Отдельную группу составили больные с тяжёлым течением рН1N1 с летальным исходом в возрасте 19-61 лет (n=10). Диагноз был подтверждён с помощью метода ПЦР.

Забор крови для определения уровня противовоспалительных цитокинов производили в остром периоде (1-2 день болезни) и периоде ранней реконвалесценции (на 7-9 день болезни). Уровень цитокинов определяли в сыворотке крови методом ИФА коммерческими тест-системами "Вектор-Бест", Россия [6].

Результаты клинических и лабораторных исследований были внесены в специально разработанные карты индивидуального обследования пациентов с последующим представлением в виде электронных таблиц Microsoft Excel 2007. Статистическая обработка результатов исследований была проведена с использованием пакета StatGraphics 15.0.

Нормальность распределения вариационных рядов (соответствие закону Гаусса) проверяли с помощью критериев согласия Колмогорова-Смирнова, Пирсона и Шапиро-Вилкса, одного из самых мощных критериев нормальности [2]. При выполнении гипотезы нормальности распределения в качестве точечной оценки характеристики центра группирования значений случайной величины использовалось выборочное среднее (M_0). В случае нормального распределения каждой из выборок межгрупповые различия выявляли при помощи t-критерия Стьюдента и точного критерия Фишера для сравнения дисперсий [2, 5].

Наиболее часто распределение рядов не соответствовало критериям нормальности, что согласуется с литературными данными. Так, по некоторым данным [5], только 20% распределений количественных признаков, встречающихся в медико-биологических исследованиях, являются приближённо нормальными. При не выполнении гипотезы нормальности распределения в соответствии с рекомендациями [2, 5] были использованы методы непараметрической статистики. В частности, в качестве точечной оценки характеристики центра группирования значений случайной величины использовали медиану (Me) – показатель наименее подверженный влиянию со стороны индивидуальных колебаний признака [2, 5]. Между собой выборки сравнивали с помощью непараметрических критериев: Вилкоксона-Манна-Уитни – рангового критерия, хорошо приспособленного для анализа малых выборок и робастного к виду закона их распределения, а также двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова [2, 5].

Содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 в крови большинства пациентов находилось ниже порога чувствительности метода лабораторного анализа [6], вследствие чего выборки с результатами лабораторных анализов имели "0" в большинстве позиций. Это обстоятельство привело к нулевому значению оценки медианы ($Me=0$) и невозможности сравнения выборки по данному параметру [2]. С учётом того, что содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 в крови пациентов было распределено по экспоненциальному закону (в связи с выполнением критерия экспоненциальности распределения Шапиро-Уилка [2]), в качестве точечной оценки характеристики центра группирования значений данных факторов мы использовали выборочное среднее (M_0) [2, 5, 6].

Уровень значимости при проверке всех статистических гипотез – $p < 0,05$ (доверительная вероятность $> 0,95$).

Контролем служила кровь 18 здоровых доноров в возрасте 19-40 лет. Полученные нами значения цитокинов у контрольной группы лиц полностью согласуются с выборочными средними показателями, полученными при обследовании

сыворотки крови 68 здоровых доноров фирмой-производителем тест-систем "Вектор-Бест" (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация цитокинов в сыворотке крови здоровых доноров (согласно настоящему исследованию и данным "Вектор-Бест")

Цитокины	Уровень цитокинов, пг/мл		Уровень цитокинов согласно данным "Вектор-Бест", пг/мл	
	Ме (для IL-1Ra) или Мо (для IL-4, IL-10)	Диапазон значений	Мо	Диапазон значений
IL-1Ra	619,55, n=16	74,7-3000	520	50-1000
IL-4	0,021, n = 16	0-0,334	0,2	0-4
IL-10	5,970, n=17	0-88,951	5	0-31

Результаты и обсуждение. Сравнительная характеристика динамики концентрации цитокинов в остром периоде и в периоде реконвалесценции в сыворотке крови больных гриппом рН1N1 представлена в табл. 2.

Таблица 2

Сравнительная характеристика концентрации противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных гриппом рН1N1

Группы больных в зависимости от степени тяжести заболевания		Ме (для IL-1Ra) или Мо (для IL-4 и IL-10), диапазон значений (указан в скобках), пг/мл	
Период		Острый период	Период реконвалесценции
Грипп рН1N1 (среднетяжёлое течение)	IL-1Ra	1640 (336,8-3000) [#] , n = 17	1246,7 (221,9-3000) [*] , n = 20
	IL-4	3,801 [#] , n = 17	2,330 ^{*#} , n = 20
	IL-10	9,080 ^{**#} , n = 15	6,922 ^{*#} , n = 17
Грипп рН1N1 (тяжёлое течение /умершие/)	IL-1Ra	2823,8 (753,3-3000) [#] , n = 10	-
	IL-4	0 [#] , n = 10	-
	IL-10	44,958 [#] , n = 10	-

Примечание:

* – достоверные различия показателей в динамике заболевания (p<0,05).

** – достоверные различия между группой больных со среднетяжёлым и тяжёлым течением гриппа рН1N1 (p<0,05).

[#] – достоверное отличие от контроля (p<0,05).

n – число обследованных пациентов.

В остром периоде гриппа рН1N1 выявлено достоверное повышение концентрации всех исследованных цитокинов (IL-1Ra, IL-4 и IL-10) (p<0,05), что свидетельствует об их важнейшей роли в патогенезе заболевания. Дальнейшие изменения были следующими. Так, была отмечена нормализация IL-1Ra к периоду реконвалесценции. Уровень же IL-10, хотя также достоверно снижался к периоду реконвалесценции (по сравнению с острым периодом) (p<0,05), но он не приходил в норму. Уровень IL-4 с течением времени достоверно снижался (p<0,05). У всех больных с тяжёлым течением гриппа рН1N1 IL-4 не был определён (фактор отсутствовал или находился ниже порога чувствительности использованной тест-системы).

Как видно из таблицы 2, самый большой средний показатель IL-10 был определен у больных с тяжёлым течением гриппа и последующим летальным исходом (44,958 пг/мл). Он был достоверно выше концентрации IL-10 в сыворотке крови



больных, находящихся в остром периоде среднетяжёлого течения гриппа рН1N1 (что согласуется с данными J.F. Vermejo-Martin с соавторами [12]).

Максимальный уровень IL-1Ra был зарегистрирован также у лиц с тяжёлым течением гриппа рН1N1 (Me=2823,8 пг/мл), что практически в два раза превышало значение IL-1Ra у больных среднетяжёлым течением рН1N1 (Me=1640 пг/мл) в соответствующем периоде, но без статистически достоверного отличия между указанными выборками ($p > 0,05$). Данный факт предполагает то, что при тяжёлой форме гриппа рН1N1 тенденцией к повышению уровня IL-1Ra организм человека пытается ограничить всё возрастающее токсическое действие мощного провоспалительного IL-1, активно участвующего в развитии гиперцитокинемии, лежащего в основе описываемого при гриппе рН1N1 «цитокинового шторма» [12].

Выводы. В связи с преобладающим местным (дистантным), а не системным действием исследованных цитокинов, быстрое разрушение и/или связывание их со специфическими рецепторами (в течение 10-15 минут), обуславливает то, что их концентрация в периферической крови не достаточно точно отражает те процессы, которые происходят в зоне воспаления. Однако трудности исследования концентрации противовоспалительных цитокинов и активности соответствующих клеточных популяций по их синтезу в месте воспаления обуславливает необходимость поиска косвенных признаков, характеризующих протекание воспалительной реакции при гриппе рН1N1 и активацию гуморального звена иммунитета, где данные цитокины играют ведущую роль.

Согласно результатам исследования, у больных гриппом реакция иммунной системы характеризуется повышенной концентрацией всех противовоспалительных цитокинов в остром периоде заболевания с последующим (к периоду реконвалесценции) снижением его уровня до нормы (IL-1Ra) или выше нормы (IL-4, IL-10).

Выявленные изменения уровня IL-4 и IL-10 при среднетяжёлой форме свидетельствуют о значительной активации Th2-клеточного звена иммунитета. Так, высокий уровень IL-4 был отмечен у больных среднетяжёлой формой (как в остром периоде, так и в периоде реконвалесценции). В таких случаях создаётся реальная вероятность возникновения дисрегуляции цитокиноопосредованных механизмов кооперации Т-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов и нейтрофилов с, возможно, нарушением баланса в сторону усиления Th2-ответа организма при среднетяжёлой форме гриппа.

Выявленное полное отсутствие IL-4 в периферической крови при тяжёлом течении гриппа рН1N1, косвенно свидетельствующее о снижении количества IL-4 в месте воспаления (в лёгочной ткани), характеризует явный сдвиг баланса Th1-/Th2-лимфоцитов в сторону усиления активности Th1-лимфоцитов с гиперпродукцией ими IFN- γ и усиления активности моноцитов/макрофагов с ещё большим для организма синтезом мощным провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и др), что согласуется с данными литературы [12, 13] и собственными ранее полученными данными [10].

Исходя из полученных данных, отсутствие IL-4 в системном кровотоке и достоверно высокий уровень IL-10 и IL-1Ra, определённый при тяжёлом, летальном течении гриппа рН1N1, можно рассматривать как неадекватную реакцию организма при тяжёлой форме гриппа рН1N1 (в отличие от его среднетяжёлой формы).

Практическая значимость. Определено прогностическое значение уровня противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных гриппом рН1N1. Исходя из полученных в результате исследования данных, высокая концентрация в остром периоде IL-1Ra (с нормализацией к периоду реконвалесценции), и IL-4, IL-10 (со снижением их концентрации к периоду реконвалесценции) свидетельствуют о сохранении клеточного баланса между выработкой провоспалительных и противовоспалительных факторов и, как следствие, о благоприятном течении заболевания. Отсутствие у больных гриппом рН1N1 IL-4 в сыворотке крови может рассматриваться в качестве одного из дополнительного лабораторного маркера тяжёлого течения заболевания.

Полученные данные о состоянии основных противовоспалительных факторов цитокиновой сети в норме и у больных гриппом pH1N1 были использованы при создании экспертной системы "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ" [9]. Перспективным направлением в лечении является использование лекарственных средств, корригирующих выявленный в результате исследования цитокиновый дисбаланс.

Литература

1. Иванов, А.А. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии / А.А. Иванов, О.П. Гладких, А.В. Кузнецова, Т.И. Данилова // Молекулярная медицина. – 2005. – №2. – С. 16-21.
2. Кобзарь, А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников / А.И. Кобзарь. – М.: Физматлит. – 2006. – 816 с.
3. Нагоев, Б.С. О роли цитокинов в регуляции иммунной системы при инфекционных заболеваниях / Б.С. Нагоев, М.Х. Нагоева, Э.А. Камбачокова // Материалы III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 28-30 марта 2011 года). – Инфекционные болезни. – 2011. – Том 9. – Приложение №1. – М. – 2011. – С. 260.
4. Новицкий, В.В. Молекулярные механизмы нарушения взаимодействия эффекторных клеток крови при патологии инфекционной и неинфекционной природы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – №4. – 36-48.
5. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера. – 2002. – 312 с.
6. Рябичева, Т.Г. Определение цитокинов методом иммуноферментного анализа / Т.Г. Рябичева, Н.А. Вараксин, Н.В. Тимофеева, М.Ю. Рукавишников // Информационный бюллетень "Новости "Вектор-Бест". – 2004. – № 4. – Т. 34. – С. 4.
7. Симбирцев, А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – №1. – С. 9-17.
8. Тотолян, А.А. Клетки иммунной системы / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин. – СПб.: Наука. – 2000. – 231 с. – (серия учебных пособий. Т. 1., Т. 2).
9. Усков, А.А. Экспертная система "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ" / А.А. Усков, М.В. Шипилов // Информатика, математическое моделирование, экономика: сборник научных статей по итогам Международной научно-практической конференции (г. Смоленск, 22 апреля 2011 г.). – Смоленск. – 2011. – Т.1 – С. 185-188.
10. Шипилов, М.В. Цитокиновый профиль у больных гриппом pH1N1 / М.В. Шипилов, Е.В. Волчкова, Ф.Л. Кутарев // Материалы III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 28-30 марта 2011 года). – Инфекционные болезни. – 2011. – Т. 9. – Приложение №1. – С. 410-411.
11. Belz, G.T. Regulating inflammatory diseases. Life in the balance: killer T-cell self control fends off lethal influenza? / G.T. Belz // Immunology and Cell Biology. – 2009. – № 87. – P. 364-365.
12. Bermejo-Martin, J.F. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza / J.F. Bermejo-Martin (and oth.) // Crit Care. – 2009. – Vol. 13. – №6. – P. 201.
13. Nagau, N. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. / N. Nagau (and oth.) // Crit. Care. – 2010. – Vol 14. – №6. – P 203.
14. McKinstry, K.K. IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge / K.K. McKinstry (and oth.) // J. Immunol. – 2009. – № 182, Vol. 12. – P. 7353-7363.

SOME CHANGES OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN INFLUENZA PH1N1

U.V. IVANOV¹
M.V. SHIPILOV²
V.V. IVANOV³

¹⁾ *Clinical hospital №83 of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow*

²⁾ *Smolensky State University*

³⁾ *Advisory-diagnostic polyclinic №1, Smolensk*

e-mail: med_infect@land.ru

Investigated by enzyme immunoassay in the serum concentration of 30 patients with influenza pH1N1 major anti-inflammatory cytokines: receptor antagonist of interleukin-1 (IL-1Ra), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10). Control was blood of healthy donors (n=18). Defined by an increased concentration of cytokines in acute moderate form of the disease with a subsequent decrease (to a period of convalescence) its level to normal (IL-1Ra) or above normal (IL-4, IL-10). The peculiarity of the severity of the influenza pH1N1 was a higher level of IL-1Ra and IL-10 in the absence of IL-4 in the systemic circulation. The results were used to create an expert system "Quick diagnosis and prognosis of ARVI".

Key words: influenza pH1N1, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, interleukin-10.