

Л.Ф. Притуло¹, Ю.А. Бисюк¹, В.П. Притула², Т.Г. Филоненко¹, О.В. Спахи³,
Д.В. Шаевский¹, Е.В. Ионичева¹

Содержание провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1, 2 типов как иммунорегуляторный критерий у детей с гнойно-септическими заболеваниями

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь,
Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев,
Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: провоспалительные медиаторы, цитокины Т-хелперов 1, 2 типов, гнойно-септические заболевания, дети.

Для изучения провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1, 2 типов проведено исследование с участием 444 детей. При гнойно-септических заболеваниях у детей наблюдается повышенная секреция провоспалительных медиаторов, которая связана с преимущественным синтезом цитокинов клеточного профиля (IL-2, IF- γ).

Вміст прозапальних медіаторів і цитокінів Т-хелперів 1, 2 типів як імунорегуляторний критерій у дітей з гнійно-септичними захворюваннями на етапі госпіталізації

Л.Ф. Притуло, Ю.А. Бисюк, В.П. Притула, Т.Г. Филоненко, О.В. Спахи, Д.В. Шаєвський, К.В. Іонічева

Для вивчення прозапальних медіаторів і цитокінів Т-хелперів 1, 2 типів здійснено дослідження за участю 444 дітей. При гнійно-септичних захворюваннях у дітей спостерігається підвищена секреція прозапальних медіаторів, що пов'язана з перевагою цитокінів клітинного профілю (IL-2, IF- γ).

Ключові слова: прозапальні медіатори, цитокіни Т-хелперів 1, 2 типів, гнійно-септичні захворювання, діти.

Патологія. – 2012. – №1 (24). – С. 49–52

The content of proinflammatory mediators and cytokines of 1, 2 types T-helpers as immunoregulatory criterion in children with purulent-septic diseases at a stage of hospitalization

L.F. Pritulo, Yu.A. Bisyuk, V.P. Pritula, T.G. Filonenko, O.V. Spakhi, D.V. Shaevskiy, E.V. Ionicheva

For studying of proinflammatory mediators and cytokines of 1, 2 types T-helpers 444 children were examined. It is established that purulent-septic diseases in children are associated with hypersecretion of proinflammatory mediators and cellular profile cytokines (IL-2, IF - γ).

Key words: proinflammatory mediators, citokines of 1, 2 types T-helperS, purulent-septic diseases, children.

Pathologia. 2012; №1 (24): 49–52

Воспаление при гнойно-септических заболеваниях у детей приводит к выделению биогенных аминов, эйкозаноидов, фактора активации тромбоцитов, провоспалительных цитокинов, интерлейкинов 1, 6, альфа-фактора некроза опухолей, а также целой группы не до конца изученных хемотоксических факторов [1]. Основными продуцентами провоспалительных медиаторов на начальном этапе выступают эндотелиальные клетки [2]. В процессе активации эндотелиальных клеток важную роль отводят липополисахариду (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательной флоры, колонизирующей кишечник человека. Считается, что ЛПС является ключевым агонистом синтеза провоспалительных цитокинов при перитоните, запуская каскад патофизиологических реакций, ответственных за развитие полиорганных осложнений при перитоните [3]. Повреждение клеток и тканей воспалительными медиаторами ведет к нарушению их жизнедеятельности [4].

Цель работы

Изучение роли провоспалительных медиаторов с учетом иммунорегуляторного влияния цитокинов Т-хелперов 1, 2 типа у детей с различными формами гнойно-септических заболеваний на этапе госпитализации.

Пациенты и методы исследования

Для изучения цитокинового статуса при острой гнойно-деструктивной пневмонии (ОГДП) проведено исследование у 220 детей, госпитализированных в хирургическое отделение Республиканской детской клинической больницы г. Симферополя.

Из 220 больных с ОГДП у 140 (64%) была легочная форма пневмонии, у 80 (36%) – легочно-плевральная. Возраст больных – от 1 года до 14 лет.

При ОГО проведено исследование у 110 детей, госпитализированных в хирургическое отделение Республиканской детской клинической больницы г. Симферополя.

Таблица 1

Уровни провоспалительных цитокинов и СРБ у детей с гнойно-деструктивными пневмониями (M±m, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Легочная форма (n=140)	Легочно-плевральная форма (n=80)
ИЛ-1β	16,36±0,75	53,79±1,69	59,18±2,76
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	>0,05
ИЛ-6	31,16±0,65	58,03±1,34	59,96±2,11
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	>0,05
ФНО-α	16,97±0,68	102,61±5,17	113,86±7,41
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	>0,05
СРБ (мкг/мл)	11,82±0,30	20,96±0,50	22,86±0,58
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	>0,05

Примечания: P1 – достоверность различия показателей контрольной группы с показателями легочной и легочно-плевральной группы; P2 – достоверность различия показателей легочной группы с показателями легочно-плевральной и контрольной группы.

Анализ *таблицы 1* свидетельствует, что значения ИЛ-1β, ФНО-α и СРБ были достоверно выше (P<0,01) в сравнении с показателями контроля. Эти показатели достоверно не отличались между легочной и легочно-плевральной формой. Полученные результаты согласуются с данными специализированной литературы [6], хотя тяжесть состояния не влияет на интенсивность экспрессии провоспалительных медиаторов. Очевидно, что такая закономерность лежит в плоскости иммунорегуляторного влияния Т-хелперов 1, 2 типа. Как следствие, следующим этапом стало изучение иммунорегуляторной активности цитокиновых профилей 1 и 2 типов.

Концентрация основных цитокинов 1 и 2 типов представлена в *таблице 2*.

Таблица 2

Уровни цитокинов клеточного и гуморального профиля у детей с гнойно-деструктивными пневмониями (M±m, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Легочная форма (n=140)	Легочно-плевральная форма (n=80)
ИЛ-2	16,17±0,16	19,47±0,27	20,66±0,36
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	<0,05
ИФ-гамма	24,08±0,38	29,91±0,59	30,53±0,58
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	>0,05
ИЛ-4	148,53±2,07	109,76±1,83	103,63±2,01
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	>0,05
ИЛ-10	208,80±1,78	154,40±2,03	154,80±2,37
P1	-	<0,01	<0,01
P2	<0,01	-	>0,05

Примечания: P1 – достоверность различия показателей контрольной группы с показателями легочной и легочно-плевральной группы; P2 – достоверность различия показателей легочной группы с показателями легочно-плевральной и контрольной группы.

Диагноз острого гематогенного остеомиелита устанавливали на основании клинических, рентгенологических и лабораторных данных в соответствии с приказом МОЗ Украины №88-Адм от 30.03.2004. Клинические формы ОГО устанавливали по классификации Т.П. Краснобаева.

При перитоните проведено исследование у 114 детей, госпитализированных в хирургическое отделение Республиканской детской клинической больницы г. Симферополя.

Контрольную группу составили 110 условно здоровых детей того же возраста.

Количество мальчиков и девочек, а также возраст в исследуемых группах статистически не отличались.

Исследование концентрации цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИФ-γ) в сыворотке крови осуществляли иммуноферментным методом на основе двухэтапного процесса с пероксидазой хрена в качестве индикаторного фермента. Использовали наборы реагентов «Diacclone» для определения ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и «Immunotech» для ИФ-γ (Франция). Измерение активности связанной пероксидазы проводили на автоматическом фотометре для микропланшетов «Stat Fax 2100» (США).

Спектр исследуемых цитокинов выбран исходя из классических представлений предопределения клеточного и гуморального типов (компонентов) иммунного ответа. ИЛ-2 и ИФ-γ выбраны как наиболее характерные цитокины Th1-клеток, а ИЛ-4 и ИЛ-10 – Th2-клеток. При этом, ИЛ-10 и ИФ-γ, что хорошо известно, являются критериями реципрокного влияния Th1- и Th2-хелперных типов друг на друга.

Для определения провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α) использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа при помощи тест-систем производства института им. Л. Пастера (Санкт-Петербург) и ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург). Содержание цитокинов выражали в пг/мл.

Содержание СРБ в сыворотке крови определяли «сэндвич»-вариантом тИФА с использованием биотин-стрептавидиновой системы усиления сигнала. Источником антител к СРБ служила коммерческая овечья антисыворотка к СРБ человека производства ООО «Микрофлора» при МНИИ им. Г.Н. Габричевского (Россия). Оптическую плотность конечного продукта ферментативной реакции определяли с помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 2100 (Awareness Tech. Inc., USA) при длине волны 492 нм. Содержание СРБ выражали в мкг/мл.

Для проверки распределения на нормальность использовали Хи-квадрат и критерий W Шапиро-Уилка, сравнение центральных тенденций двух независимых выборок – с использованием W-критерия Вилкоксона, сравнение средних двух независимых выборок – по критерию Стьюдента. Для множественного сравнения непараметрических данных использовали ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса и критерий Дана [5].

Результаты и их обсуждение

Показатели провоспалительных цитокинов и СРБ представлены в *таблице 1*.

С помощью анализа данных *таблицы 2* можно выявить следующие характеристики: уровни цитокинов клеточного профиля (цитокины Т-хелперов 1 типа) достоверно выше показателей контроля ($P<0,01$), а цитокины гуморального профиля (цитокины Т-хелперов 2 типа) достоверно ниже ($P<0,01$); при сравнении этих показателей легочной и легочно-плевральной формы достоверно отличались только уровни ИЛ-2 ($P<0,05$).

При таком классификационном анализе с учетом иммунорегуляторных цитокинов у больных с гнойно-деструктивной пневмонией наблюдается активация клеточного звена иммунитета и суппрессия гуморального.

Статистическому анализу подвергнуты показатели провоспалительных цитокинов у детей с различными формами ОГО. Результаты анализа представлены в *таблице 3* и свидетельствуют о наличии активации провоспалительных медиаторов. Так, значение ИЛ-1 β достоверно выше ($P<0,01$) у детей со всеми формами ОГО по сравнению с контролем. При токсической форме ОГО уровень ИЛ-1 β был самым высоким ($78,41\pm 10,49$ пг/мл) и при множественном сравнении достоверно отличался ($P<0,05$) от септико-пиемической и локальной формы. Значения ИЛ-6 и ФНО-альфа достоверно увеличивались ($P<0,01$) при всех формах ОГО по сравнению с контрольными показателями, а для локальной формы ОГО эти показатели были самыми низкими и достоверно отличались от токсической и септико-пиемической формы. Уровень СРБ в статистическом контексте повторил динамику ИЛ-1 β , значения которого были достоверно

выше ($P<0,01$) контроля с самым высоким уровнем для токсической формы ($58,46\pm 14,44$ мкг/мл).

Таким образом, полученные данные (*табл. 1*) указывают на интенсивность воспалительного процесса, степень выраженности которого тесно зависит от формы ОГО.

Полученные результаты о степени воспалительной реакции при ОГО связаны с особенностями патогенеза этого заболевания, механизмы регуляции которого лежат в плоскости иммунорегуляторного влияния цитокинов Т-хелперов 1 и 2 типов.

Следующим этапом работы стал анализ цитокиновой регуляции воспаления у детей с ОГО. Уровни цитокинов Т-хелперов 1 и 2 типов представлены в *таблице 4*.

При статистическом анализе данных *таблицы 4* выявлены следующие закономерности: уровни цитокинов Т-хелперов 1 типа (ИЛ-2, ИФ- γ) были достоверно выше ($P<0,01$) показателей контрольной группы, а цитокинов 2 типа – достоверно ниже ($P<0,01$). При множественном статистическом анализе достоверности отличий для этих показателей между формами ОГО не зафиксировано, кроме ИЛ-10, уровень которого ($102,50\pm 5,26$ пг/мл) был самым низким для локальной формы и достоверно отличался от токсической и септико-пиемической формы.

Выявленные изменения (*табл. 4*) указывают на цитокиновый дисбаланс Т-хелперов 1, 2 типов с активацией цитокинов клеточного типа и угнетением гуморальных, кроме того, дисрегуляция цитокинов не зависит от формы ОГО. Несомненно, интерпретация выявленных изменений в той или иной мере связана с типом возбудителя.

Таблица 3

Уровни провоспалительных цитокинов и СРБ у детей с различными формами острого гематогенного остеомиелита на 1 сутки ($M\pm m$, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Токсическая форма (n=15)	Септико-пиемическая форма (n=36)	Локальная форма (n=59)
ИЛ-1 β	16,36 \pm 0,75	78,41 \pm 10,49 *, ##	51,01 \pm 4,54 *	33,39 \pm 1,97 *
ИЛ-6	31,20 \pm 0,52	74,08 \pm 9,29 *	59,96 \pm 5,02 *	43,1 \pm 2,16 *, #
ФНО-альфа	16,97 \pm 0,68	82,88 \pm 13,66 *	72,39 \pm 10,09 *	37,59 \pm 3,33 *, ##
СРБ (мкг/мл)	11,82 \pm 0,30	58,46 \pm 14,44 * #	29,07 \pm 4,34 *, ##	17,38 \pm 1,38 **

Примечания: * – $P<0,01$, достоверность различий показателей опытных групп от контроля; # – $P<0,01$; ## – $P<0,05$ – достоверность различий показателей опытной группы от двух других.

Таблица 4

Уровни цитокинов клеточного и гуморального профиля у детей с различными формами острого гематогенного остеомиелита на 1 сутки ($M\pm m$, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Токсическая форма (n=15)	Септико-пиемическая форма (n=36)	Локальная форма (n=59)
ИЛ-2	16,17 \pm 0,16	45,61 \pm 5,50*	28,73 \pm 1,72*	22,11 \pm 1,40*
ИФ-гамма	24,31 \pm 0,30	38,83 \pm 2,03*	33,01 \pm 2,68*	30,85 \pm 1,54*
ИЛ-4	150,10 \pm 1,65	89,87 \pm 9,17*	81,13 \pm 5,66*	83,69 \pm 4,60*
ИЛ-10	208,80 \pm 1,78	126,40 \pm 10,21*	129,41 \pm 7,22*	102,50 \pm 5,26* #

Примечания: * – $P<0,01$, достоверность различий показателей опытных групп от контроля; # – $P<0,01$; ## – $P<0,05$ – достоверность различий показателей опытной группы от двух других.

Выводы

Гиперсекреция провоспалительных медиаторов у детей с гнойно-септическими заболеваниями связана с дисбалансом в системе цитокиновой регуляции Т-хелперов 1, 2 типов, который проявляется гиперсекрецией цитокинов клеточного профиля (ИЛ-2, ИФ- γ) и снижением гуморального (ИЛ-4, ИЛ-10).

Список литературы

1. *Кетлинский С.А.* Современные аспекты изучения цитокинов / А.С. Кетлинский // Рос. иммунологический журнал. – 1999. – Т. 1, №4. – С. 46–52.
2. *Mundy G.R.* Cytokines and bone remodeling / Mundy G.R. // Oppenheim J.J. Clinical application of cytokines Role in pathogenesis, diagnosis, and therapy / Oppenheim J.J., Rossio J.L., Gearing A.J.H (eds) – Oxford University Press, Oxford, 1993. – P. 347–356.
3. *Hart P.H.* IL-4 suppresses IL-1 β , TNF- α and PGE2 production by human peritoneal macrophages / Hart P.H., Cooper R.L., Finlay-Jones J.J. // Immunology. – 1991. – Vol. 72. – P. 344–349.
4. *Mantovani A.* Chemokines and chemokine receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 versus Th2 responses / Mantovani A., Allavena P., Vecchi A., Sozzani S. // Int. J. Clin. Lab. Res. 1998. – Vol. 28. – P. 77–82.
5. *Лапач С.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях / Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. – К.: Морион, 2000 – 319 с.
6. *Устьянцева И.М.* Влияние факторов воспаления на течение внебольничной пневмонии / И.М. Устьянцева, М.А. Скопинцев, О.В. Петухова // Вестник кузбасского научного центра, посвященный 60-летию Российской академии медицинских наук. – 2005. – № 1. – С. 111–118.
7. *Притуло Л.Ф.* Патогенетическая иммунокоррекция у детей с различными формами грамтрицательного септического процесса / Притуло Л.Ф., Спахи О.В. // Актуальні питання медичної науки та практики. – 2010. – Т. 2, вип. 77, кн. 1 – С. 376–384.

Сведения об авторах:

Притуло Л.Ф., д. мед. н., профессор, зав. каф. детской хирургии КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Бисюк Ю.А., к. мед. н., доцент каф. детской хирургии КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Притула В.П., д. мед. н., профессор каф. детской хирургии НМУ им. А.А. Богомольца.

Филоненко Т.Г., к. мед. н., доцент каф. патологической анатомии КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Спахи О.В., д. мед. н., доцент каф. детской хирургии и анестезиологии ЗГМУ.

Шаевский Д.В., к. мед. н., доцент каф. детской хирургии КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Ионичева Е.В., к. мед. н., ассистент каф. детской хирургии КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Адрес для переписки:

Спахи О.В. 69035, г. Запорожье, пр-т Маяковского, 26, каф. детской хирургии и анестезиологии ЗГМУ.

Тел.: (061) 764 30 59.

Надійшла в редакцію 22.03.2012 р.