© Притуло Л.Ф.

УДК 616.71-018.45-003+616.653.3-004-018.1

СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ И ЦИТОКИНОВ Т-ХЕЛПЕРОВ 1, 2 ТИПОВ КАК ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ КРИТЕРИЙ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ПЕРИТОНИТА С УЧЕТОМ ТИНКТОРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ НА ЭТАПЕ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ

Л.Ф.Притуло

Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского, г. Симферополь

ВМІСТ ПРОЗАПАЛЬНИХ МЕДІАТОРІВ І ЦИТОКІНІВ Т-ХЕЛПЕРІВ 1, 2 ТИПІВ ЯК ІМУНОРЕГУЛЯТОРНИЙ КРИТЕРІЙ У ДІТЕЙ З РІЗНИМИ ФОРМАМИ ПЕРИТОНІТУ З ПОГЛЯДУ ТИНКТОРІАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА НА ЕТАПІ ГОСПІТАЛІЗАЦІЇ

Резюме. Для вивчення прозапальних медіаторів і цитокінів Т-хелперів 1, 2 типів при перитоніті проведене дослідження у 114 дітей. Підвищена секреція прозапальних медіаторів при перитоніті у дітей пов'язана з перевагою цитокінів клітинного профілю (ІЛ-2, ІФ-β). Дані зміни найбільше виражені при грамнегативній інфекції.

Ключові слова: перитоніт, прозапальні медіатори, цитокіни Т-хелперів 1, 2 типів, діти.

Летальность при перитоните (Пт) колеблется в пределах от 3,3 % до 25 % после хирургического вмешательства [1, 2], что является следствием многообразных патогенетических механизмов, задействованных при данном заболевании. Представление о ведущих механизмах развития Пт с течением времени претерпели определенную трансформацию. В настоящее время проблема Пт все больше рассматривается как проблема воспаления [3].

Нами показано, что при Пт у детей наблюдается резкое снижение клеточного и гуморального звена иммунитета в ассоциации с повышением экспрессии проапоптотического маркера CD95 и HLA II. Кроме того, признаки комбинированного приобретенного иммунодефицита в случае грамотрицательной флоры превосходят по тяжести грамположительную и смешанную субгруппу с максимальной степенью выраженности при разлитой форме Пт.

Воспаление при Пт приводит к выделению биогенных аминов, эйкозаноидов, фактора активации тромбоцитов, провоспалительных цитокинов, а также целой группы полностью не изученных хемотаксических факторов. Основными продуцентами провоспалительных медиаторов на начальном этапе выступают эндотелиальные клетки [4]. В процессе активации эндотелиальных клеток важную роль отводят липополисахариду клеточной стенки грамотрицательной флоры, колонизирующей кишечник человека. Считается, что монополисахарид является ключевым агонистом синтеза провоспалительных цитокинов при Пт, запуская каскад патофизиологических реакций, ответственных за развитие полиорганных осложнений при Пт (P.H.Hart et al., 1991). Повреждение клеток и тканей воспалительными медиаторами ведет к нарушению их жизнедеятельности [5].

Цель исследования. Изучить роль про-

воспалительных медиаторов с учетом иммунорегуляторного влияния цитокинов Т-хелперов 1, 2 типа у детей с различными формами Пт с учетом тинкториальных свойств возбудителя на этапе госпитализации.

Материал и методы. *Исследование проведено у 114 детей с Пт в возрасте 1-14 лет, госпитализированных в хирургическое отделение Республиканской детской клинической больницы г. Симферополя. Согласно классификации В.К.Гостищева (1992), больные Пт распределены следующим образом: 70 детей (61,4 %) – местный Пт, 28 (24,56 %) – диффузный Пт, 16 (14,03 %) – разлитой Пт. В зависимости от тинкториальных свойств возбудителя пациенты разделены на 3 субгруппы: с грамнегативной (Гр-), грампозитивной (Гр+) и смешанной флорой. Контрольную группу составили 110 условно здоровых детей того же возраста. Количество мальчиков, девочек и возраст в исследуемых группах статистически не отличался.*

Исследование концентрации цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИФ-β) в сыворотке крови осуществляли иммуноферментным методом на основе двухэтапного процесса с пероксидазой хрена в качестве индикаторного фермента. Использовали наборы реагентов "Diaclone" – для определения ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10; "Immunotech" (Франция) – для определения ИФ-β. 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-β были выбраны как наиболее характерные цитокины Th_1-клеток, а ИЛ-4 и ИЛ-10 – Th_2-клеток. Как известно, ИЛ-10 и ИФ-β являются критериями реципрокного влияния Th_1 и Th_2 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 и ООО "Протеиновый контур" (СПб). Содержание цитокинов выражали в пг/мл.

Содержание С-реактивного белка (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" (Россия). Оптическую плотность конечного продукта ферментативной реакции определяли с помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 2100 (USA) при длине волны 492 нм. Содержание СРБ выражали в мкг/мл.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы "MedStat" (№ MS0011) ООО "Альфа" (Украина). Для проверки распределения на нормальность использовали Хи-квадрат и критерий W Шапиро-Уилка, сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с использованием W-критерия Вилкоксона и сравнение средних двух независимых выборок по критерию Стьюдента. Для множественного сравнения использовали ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса и критерий Дана (G.R.Mundy et al., 1993).

Результаты исследования и их обсуждение. Вначале статистическому анализу были подвергнуты показатели провоспалительных цитокинов и СРБ на первые сутки госпитализации.

Анализ данных, представленных в таблице 1, свидетельствует о том, что воспаление в брюшной полости при Пт у детей приводит к массивному выделению провоспалительных медиаторов и СРБ по сравнению с показателями контрольной группы. При сравнении этих данных между различ-

Таблица 1

Уровни провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка у детей с различными формами перитонита на первые сутки (M±m, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Разлитой перитонит (n=16)	Диффузный перитонит (n=28)	Местный перитонит (n=70)
ИЛ-1β	16,36±0,75	87,12±11,06*	67,33±5,04*	47,23±2,05*
ИЛ-6	31,16±0,65	108,13±3,23*	77,62±2,93*	51,92±1,57*#
ФНО-альфа	16,97±0,68	104,74±11,15*	86,17±7,71*	54,28±2,99*
СРБ (мкг/мл)	11,82±0,3	70,58±6,56*	49,65±5,61*	28,24±1,94*

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

Таблица 2

Уровни цитокинов клеточного и гуморального профиля у детей с различными формами перитонита на первые сутки (M±m, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Разлитой перитонит (n=16)	Диффузный перитонит (n=28)	Местный перитонит (n=70)
ИЛ-2	16,17±0,16	92,99±9,31*	65,76±4,73*	58,59±3,07*
ИФ-гамма	24,31±0,3	97,47±7,5*#	64,63±3,51*#	46,51±1,84*
ИЛ-4	148,53±2,07	65,90±11,09*	60,51±6,94*	67,30±4,57*
ИЛ-10	207,55±2,23	75,50±14,89*	90,67±7,9*	104,07±5,82*

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

ными формами Пт с использованием множественного статистического анализа только для ИЛ-6 были получены достоверные различия. Так, уровень этого цитокина был самым низким для местной формы Пт по сравнению с диффузной и разлитой. На данном этапе исследования полученные нами данные согласуются с литературными данными об интенсивности воспалительного процесса при Пт у детей, хотя интенсивность воспаления не зависит от тяжести состояния. Очевидно, что степень интенсивности синтеза провоспалительных цитокинов в той или иной мере зависит от регуляторного влияния цитокинов клеточного и гуморального профиля.

Анализ данных, полученных для цитокинов Th_1/Th_2 ответа (табл. 2) выявил следующее. При всех формах Пт показатели ИЛ-2 достоверно были выше от контроля. Отличия между группами с различными формами Пт оказались недостоверными (P>0,05).

Для интерферона гамма (ИФ-гамма) показатели распределились следующим образом. Для всех форм Пт значение этого цитокина было значительно выше контроля, а также наблюдалось достоверное различие между формами, причем максимальное значение ИФ-гамма было установлено в группе с разлитым Пт, а минимальное – с местным. Концентрация ИЛ-4 была снижена во всех группах по сравнению с контрольной, однако между группами отличий не было (P>0,05). Показатели ИЛ-10 были также достоверно ниже контроля, но отличия между группами не подтверждены статистически (P>0,05).

Таким образом, можно утверждать, что интенсивность воспалительного процесса в

брюшной полости при Пт 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).

Следующим этапом исследования был анализ провоспалительных медиаторов и цитокинов 1, 2 типов в исследуемой категории больных с учетом характеристики возбудителей инфекции. При анализе данных, приведенных в таблице 3, установлены следующие закономерности: уровни ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-альфа для всех субгрупп всех форм Пт были выше контроля, содержание СРБ – выше контроля для субгрупп разлитой формы и грамотрицательной субгруппы диффузной и местной форм, при этом в грамположительной и смешанной субгруппе диффузной и местной форм уровень СРБ достоверно не отличался (P>0,05) от показателей контрольной группы. При сравнении субгрупп в различных формах Пт установлено, что содержание провоспалительных медиаторов достоверно выше в грамотрицательной субгруппе по сравнению с грамположительной и смешанной, кроме того наблюдается зависимость степени воспалительного процесса от формы Пт с учетом межсубгруппового анализа (самые высокие значения провоспалительных медиаторов зафиксированы для грамотрицательной субгруппы разлитой формы Пт).

Анализ цитокинов клеточного и гуморального профиля (табл. 4) показал следующее. Уровень ИЛ-2 для всех субгрупп всех форм Пт был достоверно выше контроля. При этом наивысшим показатель был в субгруппах с грамнегативной флорой, а наименьшим – с грампозитивной. В пределах каждой из форм Пт показатели для всех субгрупп достоверно отличались между собой. При межсубгрупповом анализе установлено, что все субгруппы с одинаковой флорой имели между собой достоверные различия, причем степень повышения концентрации ИЛ-2 зависела от тяжести воспалительного процесса. Концентрация ИФ-гамма в сыворотке крови больных Пт была повышена во всех субгруппах, за исключением грамположительной субгруппы при местной форме. В пределах каждой формы субгруппы имели между собой достоверные отличия, при этом максимальное повышение установлено в грамотрицательных субгруппах, а минимальное – в грамположительных. Межсубгрупповое сравнение выявило те же закономерности, что были характерны для ИЛ-2. Уровень ИЛ-4 был ниже контроля во всех субгруппах всех форм Пт. В пределах одной формы все субгруппы отличались между собой. При этой в случае грамположительных субгрупп снижение концентрации данного цитокина было наименьшим, а в случае грамотрицательных – наибольшим. Сравнение субгрупп с аналогичными флорами выявило отличие грамотрицательной и грамположительной субгруппы разлитой формы от соответствующих субгрупп местной формы. Для ИЛ-10 установлено, что его содержание у больных с Пт было достоверно снижено по сравнению с контрольной группой во всех субгруппах. Все субгруппы в пределах одной формы Пт достоверно отличались между собой, при этом максимальное снижение уровня ИЛ-10 было в грамотрицательных субгруппах, а минимальное – в грамположительных. Анализ субгрупп с одинаковой флорой возбудителя показал, что в грамотрицательных субгруппах зафиксировано достоверное отличие между всеми субгруппами. В грамположительных субгруппах отличие установлено только для местной формы, при которой отличие от диффузной и разлитой формы было статистически достоверным. Отличие смешанных субгрупп местной и диффузной формы было также значимым на уровне P<0,01.

Проанализированные нами данные свидетельствуют о том, что грамотрицательная инфекция при Пт ассоциируется с активацией цитокинов клеточного типа и угнетением гуморального. Кроме того, данный дис-

Таблица 3

Уровни провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка с различными формами перитонита у детей в зависимости от типа возбудителя на первые сутки госпитализации (M±m, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Разлитой перитонит (n=16)		Диффузный перитонит (n=28)			Местный перитонит (n=70)		
		Гр – (n=10)	Гр + (n=6)	Гр – (n=17)	Гр + (n=5)	Смешанная (n=6)	Гр – (n=42)	Гр + (n=15)	Смешанная (n=13)
ИЛ-1β	16,36±0,75	101,33±15,73 * &м	73,76±11,67 * &д	77,60±3,45 *	37,21±2,25 *	44,79±4,07 * &м	55,67±1,99 * &д	35,65±2,77 * &р	34,95±2,66 *
ИЛ-6	31,20±0,52	108,7±3,01 * &д	106,3±5,04 * &д	76,28±2,5 * &м	84,97±5,76m * &м	82,24±6,85 * &м	51,88±1,68 * &р	52,39±3,01 * &р	50,41±2,28 *
ФНО-альфа	16,97±0,68	110,38±2,85 * &д	39,57±3,31 * &д	93,61±2,51 * &м	34,10±5,13 **	34,81±3,87 ** &м	64,10±1,27 * ## &р	23,18±1,78 ** &р	24,28±1,45 *
СРБ (мкг/мл)	11,82±0,30	79,56±4,42 * &д	42,83±3,29 * &д	57,24±2,67 * ## &м	12,24±1,77	12,65±1,47	35,76±1,4 * # &р	11,47±1,19 &р	12,31±1,71

Примечание: * – P<0,01, ** – P<0,05 – достоверность различий показателей опытных субгрупп от контрольной; # – P<0,01, ## – P<0,05 – достоверность различий показателей опытной субгруппы от двух других в пределах одной формы перитонита; &р,д,м, P<0,01 – достоверность различия субгруппы с определенной флорой возбудителя от субгруппы с аналогичной флорой при разлитой (р), диффузной (д) или местной (м) форме перитонита.

Таблица 4

Уровни цитокинов клеточного и гуморального профиля с различными формами перитонита у детей в зависимости от типа возбудителя на первые сутки госпитализации (M±m, пг/мл)

Показатели	Контроль (n=110)	Разлитой перитонит (n=16)		Диффузный перитонит (n=28)			Местный перитонит (n=70)		
		Гр – (n=10)	Гр + (n=6)	Гр – (n=17)	Гр + (n=5)	Смешанная (n=6)	Гр – (n=42)	Гр + (n=15)	Смешанная (n=13)
ИЛ-2	16,12±0,13	109,9±5,76 * # &д	58,44±3,17 * &д	78,74±2,79 * # &м	37,84±4,56 * # &м	52,31±3,58 * &м	66,45±1,13 * # &р	19,54±0,63 * # &р	40,54±1,45 *
ИФ-гамма	24,31±0,3	118,4±3,82 * # &д	62,55±4,03 * &д	75,94±2,86 * # &м	38,5±4,11 * # &м	54,35±4,29 * &м	57,44±1,01 * # &р	24,02±1,79 # &р	37,15±1,19 *
ИЛ-4	150,1±1,65	45,88±5,53 * # &м	109,2±5,76 * &м	48,98±2,78 * #	120,2±5,81 * #	76,19±3,01 *	56,71±1,37 * #	129,2±2,76 * #	82,67±2,77 *
ИЛ-10	208,8±1,78	66,23±2,86 * # &д	159,5±4,19 * &м	82,52±1,77 * # &м	165,6±5,46 * # &м	119,9±3,4 * &м	94,24±1,54 * # &р	186,9±1,91 * #	137,7±1,98 *

Примечание: * – P<0,01 – достоверность различий показателей опытных субгрупп от контрольной; # – P<0,01 – достоверность различий показателей опытной субгруппы от двух других в пределах одной формы перитонита; &р,д,м – P<0,01 – достоверность различия субгруппы с определенной флорой возбудителя от субгруппы с аналогичной флорой при разлитой (р), диффузной (д) или местной (м) форме перитонита.

баланс при грамотрицательной флоре связан с гиперактивацией провоспалительных медиаторов.

Выводы. 1. Гиперсекреция провоспалительных медиаторов в брюшной полости при перитоните у детей связана с дисбалансом в системе цитокиновой регуляции Т-хелперов 1, 2 типов, который проявляется гиперсекрецией цитокинов клеточного профиля (ИЛ-2, ИФ-β) и снижением гуморального (ИЛ-4, ИЛ-10). 2. Грамотрицательная инфекция по сравнению с грамположительной и смешанной при перитоните ассоциируется с более выраженной секрецией провоспалительных медиаторов, которая связана с преобладанием цитокинов клеточного профиля.

Перспективы дальнейших исследований. С учетом полученных данных о дисбалансе цитокинов клеточного и гуморального типов и их влиянии на интенсивность воспаления у детей с перитонитом целесообразно изучить показатели антиэндотоксинового иммунитета в контексте патогенеза гнойно-септических состояний.

Литература

1. Кетлинский С.А. Современные аспекты изучения цитокинов / А.С.Кетлинский // Рос. иммунол. ж. – 1999. – Т. 1, № 4. – С. 46-52. 2. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях / Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. – К.: Морион, 2000. – 319 с. 3. Сучасна оцінка імунологічних показників у дітей з гострим деструктивним апендицитом, ускладненим поширеними формами перитоніту / І.І.Пастернак, Б.М.Боднар, Л.О.Безруков [та ін.] // Бук. мед. вісник. – 2000. – Т. 4, № 1-2. – С. 85-87. 4. Федоров К.К. Первичный перитонит у детей / К.К.Федоров // Бюл. сибир. медицины. – 2004. – № 2. – С. 47-56. 5. Chemokines and chemokine receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 versus Th2 responses / A.Mantovani, P.Allavena, A.Vecchi , S.Sozzani // Int. J. Clin. Lab. Res. – 1998. – Vol. 28. – P. 77-82.

СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ И ЦИТОКИНОВ Т-ХЕЛПЕРОВ 1, 2 ТИПОВ КАК ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ КРИТЕРИЙ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ПЕРИТОНИТА С УЧЕТОМ ТИНКТОРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ НА ЭТАПЕ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ

Резюме. Для изучения провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1, 2 типов при перитоните проведено исследование у 114 детей. Повышенная секреция провоспалительных медиаторов при перитоните у детей связана с преимуществом цитокинов клеточного профиля (ИЛ-2, ІФ-β). Данные изменения наиболее выражены при грамотрицательной инфекции.

Ключевые слова: перитонит, провоспалительные медиаторы, цитокины Т-хелперов 1, 2 типов, дети.

THE CONTENT OF PROINFLAMMATORY MEDIATORS AND CYTOKINES OF T-HELPER OF TYPES 1, 2 AS AN IMMUNOREGULATORY CRITERION IN CHILDREN WITH VARIOUS FORMS OF PERITONITIS WITH TAKING INTO ACCOUNT TINCTORIAL PROPERTIES OF A CAUSATIVE AGENT AT THE STAGE OF HOSPITALIZATION

Abstract. In order to study the proinflammatory mediators and cytokines of T-helpers types 1, 2 an examination of 114 children has been carried out. An elevated secretion of proinflammatory mediators in case of peritonitis in children is associated with a predomination of cytokines of the cellular profile (IL-2, If-β). These changes are the most pronounced in case of a gram-negative infection.

Key words: peritonitis, proinflammatory mediators, cytokines of T-helpers of types 1, 2 , children.

S.I.Georgiievs'kyi Crimean State Medical University (Symferopol')

Надійшла 16.02.2009 р.
Рецензент – проф. Б.М.Боднар (Чернівці)