

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

Бениова С.Н., Жидков Е.М., Маркелова Е.В.

Кафедра педиатрии № 1, кафедра патологической физиологии ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Владивосток

Резюме. Представлены результаты исследования системы цитокинов у детей, больных ротавирусной инфекцией. Определения уровня цитокинов проводили на системном и локальном уровне. Анализ уровней цитокинов проводился в первые дни заболевания (1-3 день) и в динамике на 7-10 день заболевания. Установлено, что легкая и среднетяжелая формы ротавирусной инфекции у детей характеризуется повышением уровня воспалительных цитокинов на ранних этапах болезни с ограничением избыточной продукции провоспалительных цитокинов к периоду ранней реконвалесценции. У больных с тяжелой формой ротавирусного гастроэнтерита в первые дни болезни отмечался высокий уровень воспалительных цитокинов со смещением баланса в сторону противовоспалительных к периоду ранней реконвалесценции.

Ключевые слова: цитокины, ротавирусная инфекция, Th1, Th2-тип иммунного ответа, дети.

Benyova S.N., Zhidkov Ye.M., Markelova Ye.V.

PATHOGENETIC ROLE OF CYTOKINES IN CHILDHOOD ROTAVIRUS INFECTION

Abstract. Results of cytokine network studies system in children with rotavirus infection are presented. Concentrations of cytokines were determined at both local and systemic levels. Analysis of cytokine levels was performed at initial terms (day 1 to 3), and in the course of disease (day 7 to 10). It was revealed that mild and mid-severe cases of rotavirus infection in the children are characterized by early increase in proinflammatory cytokines with restricted overshoot of proinflammatory cytokines at early recovery period. Meanwhile, the patients with severe forms of viral gastroenteritis exhibited high levels of proinflammatory cytokines. However, this balance was shifted towards anti-inflammatory cytokines during early convalescence. (*Med. Immunol., 2007, vol. 9, N 6, pp 627-630*)

В последние годы ротавирусная инфекция (РВИ) является одной из самых значительных причин в развитии кишечных инфекций у детей раннего возраста [6]. Удельный вес ротавирусного гастроэнтерита в структуре острых диарей у детей первых трех лет жизни на территории России составляет 16-92% [5]. К настоящему времени хорошо изучены клинико-эпидемиологические аспекты течения ротавирусной инфекции, разработаны и внедрены в практику различные методы диагностики [1]. Вместе с тем, существует ряд клинических особенностей РВИ, которые не получили достаточного патогенетического объяснения: высокий удельный вес тяжелых форм

болезни, вирусоносительство, роль ротавирусов в формировании хронической гастроэнтерологической патологии у детей [7].

Современные достижения в области изучения иммунорегуляторных механизмов инфекционного процесса показали, что основную роль в активации и регуляции процессов иммунного ответа, определяющих тяжесть и длительность течения болезни, играют цитокины [3].

Роль цитокинов в иммунопатогенезе РВИ у детей в настоящее время изучена недостаточно, что и определило цель нашего исследования: изучение патогенетической значимости некоторых цитокинов на различных этапах РВИ у детей раннего возраста.

Адрес для переписки:

690013, г. Владивосток, ул. Невельского, 29, кв. 47.
Тел.: (4232) 52-63-84, 89025214697.
E-mail: snbeniova@mail.ru

Материалы и методы

Для решения поставленных задач было исследовано 45 детей (17 мальчиков и 28 девочек)

в возрасте от 6 мес. до 3 лет, больных ротавирусной инфекцией. Контрольную группу составили 30 здоровых детей от 6 мес. до 3 лет.

Диагноз ротавирусной инфекции был выставлен на основании анамнестических, клинико-эпидемиологических данных и подтвержден результатами бактериологических исследований и/или серологических методов исследования, обнаружении ротавирусного антигена в фекалиях методом непрямой геммаглютинации и иммуноферментного анализа.

Распределение случаев ротавирусного гастроэнтерита по тяжести проводилось в соответствии со степенью выраженности симптомов общей интоксикации и диарейного синдрома. В 11 случаях (24,4%) у детей заболевание протекало в легкой форме, в 21 случае (46,7%) отмечалась среднетяжелая степень течения заболевания, у 13 детей (28,9%) регистрировалась тяжелая форма РВИ.

Определение цитокинов в сыворотке крови и копрофильtrate проводили путем иммуноферментного анализа с использованием реактивов «R&D Diagnostics Inc.» (США) согласно прилагаемой инструкции на анализаторе Multiscan (Финляндия). Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пикограммах на миллилитр (пг/мл).

Анализ уровней цитокинов проводился в первые дни заболевания (1-3 день) и в динамике на 7-10 день заболевания.

Результаты и обсуждение

Известно, что эффективная защита организма от внутриклеточных патогенов, к которым относятся ротавирусы, происходит преимущественно с помощью формирования клеточного иммунитета, зависящего от Th1 иммунного ответа.

Анализ цитокинового профиля у больных ротавирусным гастроэнтеритом в острый период болезни выявил достоверное повышение уровня провоспалительного цитокина IFN γ как в месте входных ворот инфекции, так и на системном уровне, независимо от тяжести заболевания (табл. 1).

Активация Th1-лимфоцитов, секретирующих IFN γ и другие провоспалительные цитокины, сопровождается повышением активности макрофагов, стимуляцией фагоцитоза, внутриклеточного киллинга, антигенпрезентирующей функции моноцитов и синтеза молекул адгезии [8].

Одновременно у всех больных наблюдали активацию маркеров Th2-типа иммунного ответа. Так, уровень IL-10, естественного антагониста IFN γ , достоверно повышался в среднем в 2-12 раз в сравнении с показателями, зарегистрированными у здоровых детей. Возможно, выявленный противовоспалительный эффект направлен на предотвращение повреждающего действия избыточного клеточного ответа.

Отмечалась зависимость между увеличением уровня IL-10 и тяжестью течения ротавирусной инфекции: при легкой форме заболевания отношение IFN γ /IL-10 в сыворотке крови и в копрофильtrate больных оставалось сбалансирован-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В ОСТРЫЙ ПЕРИОД БОЛЕЗНИ (1-3 ДЕНЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ)

| Показатель в исследуемом материале | | Уровень цитокинов, пг/мл (M \pm m) | | | |
|------------------------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------|
| | | Контроль (n = 30) | Легкая форма (n = 11) | Среднетяжелая форма (n = 21) | Тяжелая форма (n = 13) |
| IFN γ | в сыворотке | 15,5 \pm 1,7 | 55,7 \pm 6,5* | 73,3 \pm 5,1* | 98,1 \pm 6,6* |
| | в копрофильtrate | 46,6 \pm 1,9 | 108,5 \pm 7,1* | 138,5 \pm 10,3* | 166,7 \pm 18,2* |
| IL-10 | в сыворотке | 14,4 \pm 1,7 | 37,7 \pm 3,7* | 86,6 \pm 7,1* | 175,3 \pm 17,9* |
| | в копрофильtrate | 36,3 \pm 3,4 | 74,8 \pm 3,2* | 136,7 \pm 12,2* | 177,6 \pm 12,7* |
| IL-12 (p40) | в сыворотке | 43,6 \pm 4,8 | 62,4 \pm 3,8** | 111,2 \pm 8,0* | 382,2 \pm 19,1* |
| | в копрофильtrate | 19,5 \pm 0,9 | 45,8 \pm 5,2* | 79,1 \pm 4,9* | 102,9 \pm 10,8* |
| IL-12 (p70) | в сыворотке | 25,3 \pm 2,2 | 49,6 \pm 4,6* | 51,0 \pm 4,5* | 62,8 \pm 7,0* |
| | в копрофильtrate | 12,9 \pm 0,7 | 40,4 \pm 4,6* | 42,3 \pm 4,6* | 46,6 \pm 5,3* |
| IFN γ /IL-10 | в сыворотке | 1,1 | 1,5 | 0,8 | 0,6 |
| | в копрофильtrate | 1,3 | 1,5 | 1,0 | 0,9 |
| IL-12 (p40)/IL-12 (p70) | в сыворотке | 1,7 | 1,3 | 2,6 | 6,1 |
| | в копрофильtrate | 1,5 | 1,1 | 1,9 | 2,2 |

Примечание. Достоверность различий с контрольной группой: * – p \leq 0,001, ** – p \leq 0,01.

ным и достоверно не отличалось от показателей контрольной группы. При среднетяжелой, а особенно, при тяжелой форме болезни данный показатель снижался, что свидетельствовало о нарастании приоритета Th2 иммунного ответа. Вероятно, это связано с феноменом деструктивной адсорбции, при которой происходит оседание ротавирусов на бактериальную клетку [2].

В последние годы было доказано, что IL-12 является ключевым цитокином в усилении клеточно-опосредованного иммунного ответа и инициации эффективной противовирусной защиты [9]. IL-12 представляет собой гетеродимер, тяжелая цепь которого (IL-12p40) является естественным конкурентным антагонистом димера (IL-12p70). Оценивая результаты исследования уровней субъединиц IL-12 (p70 и p40), определяющих преимущественные направления дифференцировки Th0 лимфоцитов на Th1 и Th2, выявлено, что легкая форма инфекции сопровождалась повышением секреции фракций IL-12 в месте локальной воспалительной реакции, тогда как на системном уровне продукция IL-12 контролировалась альтернативной субпопуляцией макрофагов Th2, продуцирующих IL-10. Такая направленность цитокинового профиля характерна для самолимитирующегося течения инфекции, при котором размножение патогенных возбудителей эффективно контролируется иммунной системой [9].

При среднетяжелой и тяжелой формах РВИ у детей наблюдалась явная гиперпродукция IL-12(p40) локально и в сыворотке крови. На ран-

них этапах болезни данный феномен, по-видимому, имеет протективный эффект, опосредованный IFN γ -зависимыми механизмами: усиленной продукцией NO и Т-клеточной инфильтрацией, усилением экспрессии адгезивных молекул и продукции хемокинов [8].

Высокая концентрация биоактивного димера IL-12 (p70) в копрофильtrate у больных с РВИ обеспечивала адекватную иммунореактивность, опосредуя экспансию различных эффекторных клеток в месте входных ворот инфекции. Снижение уровня IL-12 (p70) в сыворотке крови больных в ранние сроки болезни, по-видимому, предотвращало каскад клеточно-опосредованных иммунных реакций на системном уровне.

При исследовании уровней цитокинов в динамике болезни (7-10 день) у всех больных регистрировали снижение концентрации IFN γ в копрофильtrate и сыворотке крови пропорционально уменьшению клинических проявлений инфекционного процесса (табл. 2).

Значительное снижение уровней противовоспалительного IL-10 наблюдали в копрофильtrate, тогда как на системном уровне даже при легкой форме у больных сохранялись повышенные значения, что свидетельствовало о незавершенности иммунопатологических реакций, несмотря на купирование клинических симптомов болезни.

Неблагоприятным прогностическим фактором является сохранение высоких концентраций IL-12 (p40) в периоде ранней реконвалесценции РВИ. И если у больных со среднетяжелой формой заболевания коэффициент IL-12 (p40)/IL-12 (p70)

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В ПЕРИОД РАННЕЙ РЕКОНВАЛЕСЦЕНЦИИ (7-10 ДЕНЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ)

| Показатель в исследуемом материале | | Уровень цитокинов, пг/мл (M \pm m) | | | |
|------------------------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------|
| | | Контроль (n = 30) | Легкая форма (n = 11) | Среднетяжелая форма (n = 21) | Тяжелая форма (n = 13) |
| IFN γ | в сыворотке | 15,5 \pm 1,7 | 17,2 \pm 1,0° | 45,9 \pm 5,3*° | 81,9 \pm 6,9* |
| | в копрофильtrate | 46,6 \pm 1,9 | 48,5 \pm 2,1 ° | 114,8 \pm 4,8*°°° | 153,9 \pm 16,1* |
| IL-10 | в сыворотке | 14,4 \pm 1,7 | 16,1 \pm 1,2° | 43,4 \pm 3,8*° | 162,8 \pm 7,9* |
| | в копрофильtrate | 36,3 \pm 3,4 | 37,4 \pm 2,6° | 108,2 \pm 7,1*°°° | 164,9 \pm 9,9* |
| IL-12 (p40) | в сыворотке | 43,6 \pm 4,8 | 45,8 \pm 5,2°°° | 109,5 \pm 4,2*° | 337,9 \pm 32,8* |
| | в копрофильtrate | 19,5 \pm 0,9 | 20,6 \pm 1,7° | 63,0 \pm 3,1*°° | 97,5 \pm 7,1* |
| IL-12 (p70) | в сыворотке | 25,3 \pm 2,2 | 27,3 \pm 3,8°° | 50,8 \pm 5,3*°°° | 52,3 \pm 5,4* |
| | в копрофильtrate | 12,9 \pm 0,7 | 14,2 \pm 0,6° | 24,1 \pm 2,7*° | 32,8 \pm 1,9* |
| IFN γ /IL-10 | в сыворотке | 1,1 | 1,1 | 0,9 | 0,6 |
| | в копрофильtrate | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 0,9 |
| IL-12 (p40)/IL-12 (p70) | в сыворотке | 1,7 | 1,7 | 2,2 | 6,7 |
| | в копрофильtrate | 1,5 | 1,3 | 2,6 | 3,2 |

Примечания. Достоверность различий показателей с контрольной группой: * – $p \leq 0,001$. Достоверность различий показателей в сравнении с острым периодом: ° – $p \leq 0,001$; °° – $p \leq 0,01$; °°° – $p \leq 0,05$.

имел тенденцию к снижению, то при тяжелом течении болезни отмечалось нарастание приоритета IL-12 (p40).

Известно, что при отсутствии должного контроля синтез IL-12 (p40) ведет к избыточной активации иммунной системы с иммунопатологическими последствиями: хроническому воспалению в поврежденных органах и тканях, аутоиммунным заболеваниям [4]. Кроме того, являясь естественным антагонистом IL-12 (p70) — ключевого определителя дифференцировки хелперного ответа в пользу Th1, высокий уровень IL-12 (p40) определял низкие концентрации биоактивного димера в период ранней реконвалесценции, что, несомненно, утяжеляло течение болезни и замедляло выздоровление больных.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить различную направленность изменений цитокинового профиля у детей, больных РВИ, в зависимости от тяжести заболевания:

Легкая и среднетяжелая формы РВИ у детей характеризуется доминированием Th1-ответа на ранних этапах болезни с ограничением избыточной продукции провоспалительных цитокинов к периоду ранней реконвалесценции, что способствует благополучному течению заболевания у большинства больных.

1) У больных с тяжелой формой ротавирусного гастроэнтерита в первые дни болезни отмечается преобладающий Th1-тип дифференцировки хелперного ответа со смещением баланса цитокинов в сторону Th2 к периоду ранней реконвалесценции, что замедляет санацию очага воспаления.

2) Несмотря на то, что цитокиновые эффекты Th1 и Th2 носят антагонистический характер, мы разделяем критику ряда исследователей относительно такой упрощенной схемы оценки перекрестной регуляции Th1/Th2. Вероятно, плейотропность, дублирующие и перекрывающиеся эф-

фекты в рамках единой регуляторной иммунной системы обуславливают возможность многочисленных вариантов взаимодействия цитокинов.

Список литературы

1. Воротинцева Н.В. Острые кишечные инфекции у детей. — М.: Медицина, 2001. — 490 с.
2. Васильев Б.Я., Васильева Р.И., Лобзин Ю.В. Острые кишечные заболевания. — СПб.: Лань, 2000. — 271 с.
3. Иванис В.А., Маркелова Е.В., Скляр Л.Ф., Симакова А.И., Мандракова Н.В. Значение цитокинового статуса в изучении иммунопатогенеза инфекционных болезней // Тихоокеанский мед. журн. — 2004. — № 2. — С. 36-39.
4. Кетлинский С.А., Ищенко А.П. Цитокины и их антагонисты теория и практика // Иммунология. — 1999. — Т. 1, № 3-4. — С. 16.
5. Тихомирова О.В., Сергеева Н.В., Аксенов О.А. Ротавирусная инфекция у детей: особенности клинического течения, диагностические подходы и тактика терапии: Учебное пособие для врачей. — СПб., 2005. — 32 с.
6. Учайкин В.Ф. Решенные и нерешенные проблемы инфекционной патологии у детей // Детские инфекции. — 2003. — № 4. — С. 3-7.
7. Учайкин В.Ф. Роль ротавирусов в хронической гастроэнтерологической патологии у детей // Детские инфекции. — 2003. — № 1. — С. 10-12.
8. Фрейдлин И.С. Прикладные аспекты современного учения о цитокинах // Тихоокеанский мед. журн. — 1999. — № 3. — С. 13-19.
9. Фрейдлин И.С. Интерлейкин-12 — ключевой цитокин иммунорегуляции // Иммунология. — 1999. — № 4. — С. 5-10.

поступила в редакцию 10.04.2007
принята к печати 30.05.2007