

Котелева Светлана Игоревна

Цитокиновый профиль иммунного ответа у детей, больных коклюшем, и его изменение в зависимости от особенностей течения заболевания.

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва - 2010

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ.

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук Федорова Ирина Михайловна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Ляшенко Всеволод Андреевич

доктор медицинских наук, профессор Суслов Анатолий Петрович

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2010 г. в \_\_\_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, г. Москва.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

Л.И. Новикова

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность проблемы**

Коклюш остается серьезной проблемой в педиатрии: несмотря на успехи вакцинопрофилактики даже привитые дети могут заболеть коклюшем. Чаще всего это дети старше 6 лет, у которых напряженность иммунитета против коклюшной инфекции снизилась со временем или просто слабо ответившие на вакцину. Источником инфекции могут быть взрослые люди или дети младше года, не имеющие защитных титров от данного возбудителя (Тимченко В.Н. с соавт., 2005; Grimprel E. et al., 1996; Esposito S. et al., 2001; Hallander H.O. et al., 2005).

Коклюш является инфекционным заболеванием, характеризующимся длительным течением, даже если на фоне «коклюшной анергии» у больного не присоединяются другие инфекции. Важно исследовать, какова в этом роль иммунной системы или же длительность коклюша более объясняется действием коклюшных токсинов на центральную нервную систему больного и нарушениями, связанными с гипоксемией (Тимченко В.Н. с соавт., 2005).

Кроме того, существенной проблемой является сочетание коклюшной инфекции с другими респираторными инфекциями (Тимченко В.Н. с соавт., 2000; Торопова И.О., 2003; Бабаченко И.В., 2007; Попова О.П., Петрова М.С. с соавт., 2008; Wesley A.G. et al., 1983; Versteegh F.G. et al., 2006). В частности, распространение других инфекций, сопровождающихся длительным сухим кашлем, затрудняет своевременную диагностику коклюша у детей, подростков и взрослых и назначение им адекватной терапии.

Данных об иммунологических изменениях при коклюшной микст-инфекции относительно немного. Считается, что лимфоцитоз в начале заболевания происходит за счет выброса в кровотоки незрелых клеток. Данный феномен на поздних стадиях заболевания сменяется снижением количества лимфоцитов и численности некоторых субпопуляций. Истощение адаптивных возможностей организма, т.н. «коклюшная анергия», часто приводит к присоединению других респираторных инфекций (Тимченко В.Н. с соавт., 2005).

В последние годы исследование иммунной системы у больных коклюшем стало дополняться исследованием цитокинового профиля иммунного ответа (Бабаченко И.В., 2007; Ярв Н.Э., 2007). Делаются предположения относительно того, ка-

кую роль играют цитокиновые взаимодействия различных видов регуляторных клеток (Th1, Th2) в клиническом течении данного заболевания. Однако попытки перенести выводы, полученные в эксперименте на животных, на клинические наблюдения не особенно успешны, т.к. у больных необходимо учитывать много факторов, влияющих на течение коклюша.

Появление в последнее время новых данных об активном участии в патогенезе коклюша других видов регуляторных клеток, таких как Tr1 и Th17, оказывающих непосредственное воздействие на процессы, происходящие в легких, заставляет пересмотреть уже существующие представления об иммунопатогенезе коклюша (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2007; Leef M. et al., 2000; Stenger R.M. et al, 2009). Однако роль упомянутых регуляторных субпопуляций при коклюшной инфекции показана в респираторном тракте экспериментальных животных, а в клинике приходится судить о характере иммунорегуляторных процессов по активности лимфоцитов крови, т.к. получение бронхоальвеолярной лаважной жидкости у больных коклюшем, особенно в периоде судорожного кашля, затруднительно.

Для создания современных представлений об иммунопатологии коклюша необходимо охарактеризовать преобладающий тип цитокиновых взаимодействий на разных этапах заболевания и связать его с изменениями других параметров иммунной системы больного. При этом важно исследовать цитокиновую систему, во-первых, комплексно и, во-вторых, в динамике.

Необходимо также исследовать роль цитокиновой сети при разных формах коклюша, поскольку тип цитокинового ответа, наблюдаемый у больного, зависит от многих факторов: от самой коклюшной инфекции, от исходного типа реагирования, присущего данному организму, от присоединения других респираторных инфекций, от прививочного анамнеза и возраста больного.

Прогресс в решении этой задачи позволит оценить, насколько успешно иммунная система больного справляется с коклюшной инфекцией, и велик ли риск развития осложнений, т.е. обеспечить индивидуальный подход к лечению пациента. Поскольку выздоровление больных коклюшем является длительным процессом, исследование цитокиновой сети в динамике заболевания может дать информацию о дальнейшем функционировании иммунной системы, что особенно важно, если больной – ребенок.

## **Цель работы**

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния коклюшной инфекции и ее сочетаний с другими респираторными инфекциями на иммунную систему и продукцию цитокинов у детей в динамике заболевания.

## **Задачи исследования**

1. Исследование изменений в иммунной системе и характере продукции цитокинов при коклюше.
2. Исследование особенностей функционирования цитокиновой сети у больных, переносящих коклюш в сочетании с другими респираторными инфекциями.
3. Сравнение динамики и интенсивности продукции антител к *B.pertussis* у детей, ранее привитых против коклюша, и у непривитых. Сопоставление этих данных с продукцией цитокинов, сопровождающих реализацию иммунного ответа на коклюшную инфекцию.

## **Научная новизна**

В ходе работы проведено комплексное обследование детей, переносящих коклюш, с учетом таких особенностей как степень тяжести заболевания, присоединение сопутствующих респираторных инфекций, прививочный анамнез больного. Состояние цитокиновой сети впервые было оценено по 13 параметрам в динамике заболевания с учетом возраста ребенка. Дана оценка функциональной активности лимфоцитов крови в зависимости от наличия или отсутствия у больного лимфоцитоза.

Выявлено, что при сочетании коклюша с микоплазменной или вирусной инфекцией способность лейкоцитов больного продуцировать цитокины изменяется по сравнению с тем, как это происходит при «чистом» коклюше. Эти различия заключаются прежде всего в характере продукции ИФН $\gamma$ , снижающейся при «чистом» коклюше и его сочетании с вирусными инфекциями и сохраняющей высокий уровень в случае присоединения к коклюшу микоплазменной инфекции. При сочетании коклюша с микоплазменной инфекцией способность лейкоцитов больного

продуцировать ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-17 существенно выше, чем при других формах заболевания.

Впервые показано, что различие в прививочном анамнезе наиболее ярко отражается на индуцированной продукции ИЛ-4 и ИЛ-10. Так, у привитых детей наблюдаются высокие уровни продукции ИЛ-4, в то время как у непривитых детей наблюдается более высокая продукция ИЛ-10.

Впервые проанализирована динамика продукции ИЛ-17 при коклюше и его сочетании с другими инфекциями.

### **Практическая значимость работы**

Полученные данные используются врачами-педиатрами клинического отдела ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского для оценки течения респираторных инфекций и коррекции состояния иммунной системы детей, больных коклюшем.

### **Внедрение результатов работы**

Материалы диссертационной работы вошли в курс практических занятий по иммунологии на кафедре микробиологии Российского университета дружбы народов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Параметры функционирования цитокиновой сети у больных коклюшем резко отличаются от показателей здоровых детей и варьируют в зависимости от стадии заболевания.
2. Снижение способности лимфоцитов к продукции ИФН $\gamma$  является наиболее характерной особенностью функционирования цитокиновой сети при данном заболевании.
3. Цитокиновый профиль иммунного ответа больных коклюшем зависит от прививочного анамнеза, присоединения микоплазменной или вирусной инфекции и возраста больного ребенка.
4. В спектре цитокинов, регулирующих специфический иммунный ответ у больных коклюшем, выявляются различия между детьми, ранее привитыми от этой инфекции, и не привитыми. Наибольшие различия касаются продукции ИЛ-4 и ИЛ-10.

### **Апробация материалов диссертации**

Апробация материалов диссертации проведена на заседании Секции Ученого Совета ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского «Общая и прикладная иммунология», протокол №4 от 27 мая 2010 года.

Результаты работы доложены и обсуждены на X Всероссийском научном Форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2006), на XI Всероссийском научном Форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2007), на Объединенном иммунологическом Форуме (Санкт-Петербург, 2008) на научно-практической конференции «Современные представления об иммунокоррекции» (Пенза, 2008), на XIII Всероссийском научном Форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2009).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 101 странице и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты собственных исследований», обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 12 таблицами. Список литературы состоит из 139 работ, в том числе 41 отечественных и 98 зарубежных авторов.

### **Содержание работы**

#### **Материалы и методы исследования**

Иммунологическое обследование больных было проведено на базе ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского в лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета.

#### **Материалы исследования.**

В ходе работы было обследовано 175 детей, больных коклюшем (в том числе 41 чел. с коклюшной моноинфекцией, 34 – коклюш в сочетании с микоплазменной инфекцией, 18 – в сочетании с хламидийной, 63 – в сочетании с вирусными инфекциями) в возрасте от 1,5 до 12 лет. Повторно (через 2-4 месяца) обследовано 28 человек.

Табл.1 Объем выполненных исследований

Вид исследования	Показатель		Количество исследований
Имунофенотипирование лимфоцитов	Т-хелперы	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	191
	Т-цитотокс. клетки	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	
	В-клетки	CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	
	NK-клетки	CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	
Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови	IgG, IgM, IgA		183
	IgE		172
Диагностика респираторных инфекций (определение специфических антител IgG, IgM, IgA классов)	к Bordetella pertussis		111
	к Mycoplasma pneumoniae		169
	к Chlamydia pneumoniae		172
Определение концентрации цитокинов в сыворотке и супернатантах культуры клеток цельной крови: спонтанной и индуцированной разными митогенами	ИЛ-2	индуц. ФГА/ индуц. ФМА	69 / 46
	ИЛ-4	индуц. ФМА	66
	ИЛ-6	спонт./ индуц. ЛПС	84 / 84
	ИЛ-8	спонт./ индуц. ЛПС	91 / 91
	ИЛ-10	спонт./ индуц. ФГА	93 / 93
	ИЛ-17	спонт./ индуц. ФГА	19 / 74
	ФНО $\alpha$	спонт./ индуц. ЛПС	98 / 98
	ИФН $\gamma$	спонт./ индуц. ФГА	27 / 171
		сыворотка	40
Интерфероновый статус	спонтанная продукция ИФН		191
	индуц. продукция ИФН $\gamma$		
	индуц. продукция ИФН $\alpha$		
	ИФН в сыворотке		

Дети были госпитализированы с диагнозом «коклюш» в специализированное отделение Инфекционной клинической больницы №1 г. Москвы. Диагностика коклюша, клиническое наблюдение и терапия больных проведена к.м.н. О.П. Поповой. Диагноз «коклюш», поставленный на основании клинико-эпидемиологических данных, верифицирован бактериологическим и/или серологическими лабораторными методами.



Для оценки вклада присоединившихся инфекций в изменения иммунологических параметров при коклюше параллельно (в табл.1 не включено) было обследовано несколько групп детей: здоровые дети (58чел.), не больные коклюшем дети с длительным сухим приступообразным кашлем микоплазменной (40чел.) или не уточненной этиологии (38чел.).

Параметры функционирования цитокиновой сети больных коклюшем сравнивались с показателями детей 3-9 лет, которые по заключению педиатра были здоровы. С интервалом 5 недель дети дважды прошли иммунологическое обследование и показатели их иммунного и интерферонового статуса находились в пределах нормы.

Материалом для иммунологических исследований служили сыворотки крови, лимфоциты периферической крови больных, супернатанты стимулированных культур лейкоцитов периферической крови.

### **Методы исследования**

#### **Имунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии.**

Определение основных субпопуляций лимфоцитов крови, таких как Т-хелперы ( $CD3^+CD4^+$ ), Т-цитотоксические клетки ( $CD3^+CD8^+$ ), В-клетки ( $CD3^-CD19^+$ ) и НК-клетки ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) было проведено с помощью моноклональных антител фирмы «Beckman Coulter» на проточном цитофлюориметре «Cytomics FC500» («Beckman Coulter», США). Помимо данных об относительной численности указанных субпопуляций анализировалось изменение абсолютного количества клеток, относящихся к этим субпопуляциям.

#### **Определение сывороточной концентрации иммуноглобулинов G, M, A и E.**

Имуноглобулины классов G, M, A были определены в сыворотке крови турбидиметрическим методом на биохимическом анализаторе «Humalyzer 2000» («Human», Германия).

Концентрация IgE в сыворотке крови была определена иммуноферментным методом на тест-системе «Хема-Медика» (Россия). Данная работа была выполнена совместно с к.б.н. Наумовой М.А.

#### **Исследование интерферонового статуса.**

Интерфероновый статус исследовали микрометодом в цельной гепаринизированной крови (Ершов Ф.И., 1996). Способность лейкоцитов продуцировать интерфероны оценивали по отмене культуральными супернатантами этих лейкоцитов цитопатогенного действия тест-вируса (вирус энцефаломиокардита мышей; рабочая доза - 100 цитопатогенных доз) на культуру фибробластов. Уровень биологической активности интерферонов выражали величиной, обратной максимальному разведению тестируемого супернатанта, задерживающему цитопатогенное действие вируса на 50%, и выражали ее в ед/мл. Определяли уровень интерферона в сыворотке крови, способность лейкоцитов периферической крови к спонтанной продукции интерферонов и под действием индукторов ИФНа и ИФН $\gamma$  (вируса болезни Ньюкасла штамм Канзас, любезно предоставленный сотрудниками НИИЭМ им. Гамалеи РАМН, Москва) и ФГА-Р («Sigma», США).

#### **Стимуляция лимфоцитов к продукции цитокинов.**

Культивирование клеток цельной крови с индукторами проводили при температуре 37°C в атмосфере с 5%-ным содержанием CO $_2$  в стерильном круглодонном 96-луночном планшете для культуральной работы. Для каждого пациента использовали по 3 лунки на каждый вид стимуляции. Разведение крови в лунке культуральной средой RPMI 1640 (содержащей р-р гентамицина и L-глутамин) – 1:10.

##### **Стимуляторы:**

- фитогемагглютинин (РНА-Р, «Sigma», США) – рабочая концентрация в лунке 12,5 мкг/мл;
- липополисахарид *S.typhi* (Пирогенал, «МедГамал», Россия) - рабочая концентрация в лунке 100 нг/мл;
- форболмиристатацетат (ФМА, «Sigma», США) – рабочая концентрация в лунке 0,5 нг/мл, использовался в сочетании с иономицином («Sigma», США) - рабочая концентрация в лунке 100 мкг/мл.

Для стимуляции продукции ИФН $\gamma$ , ИЛ-10, ИЛ-17 использовался ФГА (72 часа инкубации), для ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО $\alpha$  - ЛПС *S.typhi* (24 часа инкубации), а для ИЛ-2 и ИЛ-4 – ФМА с иономицином (48 часов инкубации).

#### **Определение цитокинов методом ИФА в культурах клеток крови больного.**

Концентрацию ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17, ИФН $\gamma$ , ФНО $\alpha$  в супернатантах культур клеток цельной крови определяли методом ИФА с использованием тест-систем фирм «Цитокин» (Россия) и «Вектор-Бест» (Россия). Концентрацию цитокина, продуцируемую под действием стимулятора, сопоставляли с его спонтанной продукцией.

### **Серологическая диагностика коклюшной, микоплазменной, хламидийной и вирусных инфекций.**

Серологическая диагностика коклюша проводилась методом ИФА на тест-системах «Ridascreen Коклюш /Bordetella pertussis/» («R-biofarm AG», Германия).

Видоспецифические антитела к *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* определяли методом ИФА в периферической крови с использованием наборов «Medac» (Германия) и «Savyon» (Израиль). Данная работа была выполнена совместно с сотрудниками ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского к.м.н. Т.А. Скирдой и к.м.н. И.В. Капустиным.

Диагностика вирусных инфекций (респираторно-синтициальный вирус, вирус парагриппа, вирус гриппа, аденовирус) проводилась в Институте вирусологии им. Д.Н. Ивановского с помощью реакции иммунофлюоресценции (РИФ) в мазках из носоглотки. Данная информация предоставлялась к.м.н. О.П. Поповой.

### **Методы статистической обработки полученных результатов.**

Для определения статистической достоверности полученных результатов использовался критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между параметрами считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ . Все данные представлены в виде среднего значения и его 95% доверительного интервала. Для определения статистических параметров использовались программы MS Excel и Statistica 6.0.

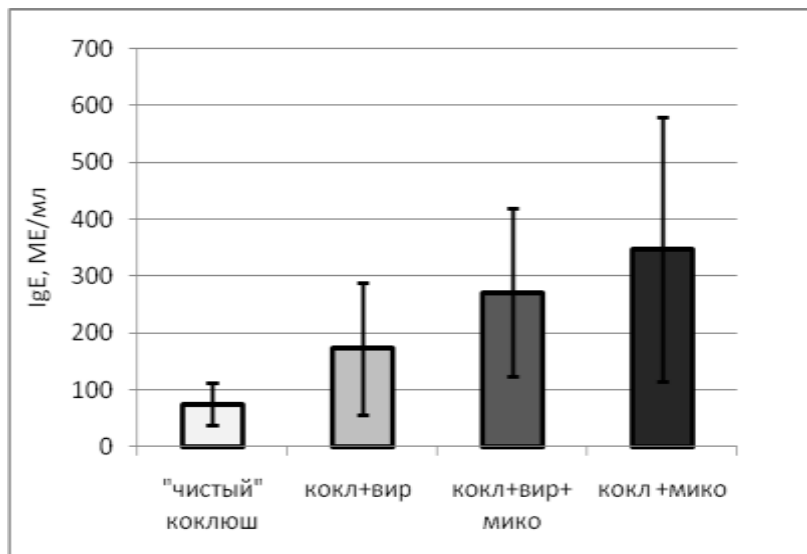
## **Результаты исследования и их обсуждение**

Наиболее характерным для коклюша изменением в количественном составе лимфоцитов является то, что это заболевание протекает на фоне длительного сохранения повышенной численности Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ) и В-лимфоцитов ( $CD19^+$ ): относительная численность Т-хелперов повышена на всех сроках заболевания у 40% детей; относительная численность В-лимфоцитов повышена на всех сроках заболевания у 60% детей.

Такое повышение абсолютной численности В-лимфоцитов связано с активным гуморальным ответом на антигены *B. pertussis*. Однако на 4 неделе от начала заболевания можно было видеть не только повышение уровня специфических антител, но и концентрации общего IgM и общего IgE.

При более подробном исследовании связи между повышенным синтезом IgE и различными клиническими формами коклюша было обнаружено, что это изменение более характерно не для самого коклюша, а для его сочетания с микоплазменной инфекцией (рис. 1.).

Рис. 1. Концентрация IgE в сыворотках крови больных коклюшем ( $M \pm tm$ ).



Сывороточная концентрация IgE повышена не только при коклюше, сочетанном с инфекцией *M. pneumoniae*, но и у детей с коклюшеподобным кашлем, вызванным *M. pneumoniae*.

Этот пример показывает, что при коклюше, который часто (у 77% больных, обследованных в ходе данной работы) протекает в сочетании с другими респираторными инфекциями, важно выделять изменения, связанные с собственно коклюшем. Поэтому в дальнейшем все показатели, в том числе динамику продукции раз-

личных цитокинов при коклюше, анализировали с учетом влияния присоединившейся инфекции.

Наиболее характерные изменения в цитокиновом статусе всех детей, больных коклюшем, по сравнению со здоровыми детьми того же возраста приведены в таблице 2.

Табл. 2 Продукция цитокинов клетками крови в культуре (пг/мл;  $M \pm tm$ ).

Цитокины	Здоровые дети 3-9 лет		Больные коклюшем 2-12 лет	
	индуц	спонт	индуц	спонт
<b>ИЛ-2</b>	<b>902 ± 372</b>	-	<b>161 ± 159 *</b>	-
<b>ИФН<math>\gamma</math></b>	<b>2312 ± 1314</b>	42 ± 46	<b>1115 ± 338 *</b>	-
<b>ФНО<math>\alpha</math></b>	<b>1799 ± 284</b>	<b>7 ± 5</b>	<b>1197 ± 320 *</b>	<b>92 ± 28*</b>
<b>ИЛ-6</b>	6401 ± 1098	48 ± 58	7004 ± 1433	206 ± 165
<b>ИЛ-8</b>	3328 ± 712	190 ± 133	3132 ± 791	376 ± 234
<b>ИЛ-4</b>	89 ± 31	-	90 ± 40	-
<b>ИЛ-10</b>	<b>206 ± 57</b>	<b>2 ± 5</b>	<b>416 ± 105 *</b>	<b>15 ± 13*</b>
<b>ИЛ-17</b>	<b>243 ± 76</b>	-	<b>469 ± 166 *</b>	-

\* - статистически значимое отличие от одноименного показателя здоровых детей

Проведенное нами сравнение показателей здоровых детей и больных коклюшем выявило значительное снижение способности лейкоцитов больных к индуцированной продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИФН $\gamma$  и ФНО $\alpha$ . Повышение индуцированной продукции у больных коклюшем по сравнению со здоровыми детьми отмечено для ИЛ-10 и ИЛ-17.

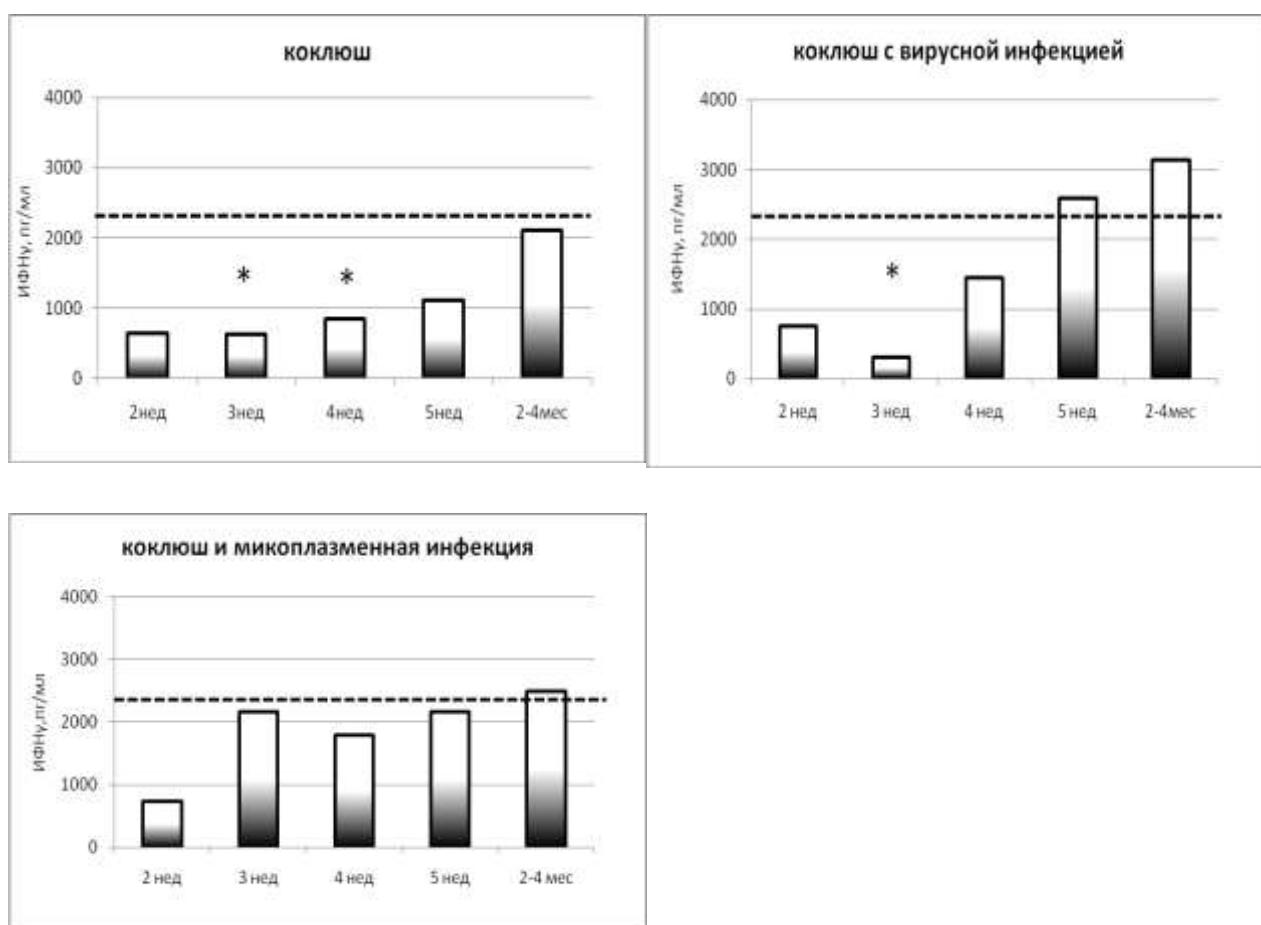
Спонтанная продукция у некоторых цитокинов (ИЛ-2, ИФН $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-17) регистрировалась на уровне ниже чувствительности тест-системы, поэтому эти данные не приведены в таблице.

Наиболее устойчивым изменением в цитокиновой сети больных коклюшем является резкое снижение индуцированной продукции ИФН $\gamma$ . У детей, переносящих коклюш как моноинфекцию, этот показатель снижен в течение 1-2 месяцев от начала заболевания. При сочетанном коклюше ситуация сходная: к 5-6 неделе про-

дукция ИФН $\gamma$  только приближается к среднему уровню показателя у здоровых детей.

Важно отметить, что на первых неделях коклюша индуцированная продукция ИФН $\gamma$  значимо ниже аналогичного показателя у здоровых детей, и только спустя 2-4 месяца от начала заболевания достигает уровня продукции, наблюдаемого у здоровых детей (рис.2).

Рис. 2. Различие в динамике продукции ИФН $\gamma$  при «чистом» коклюше и его сочетаниях с другими респираторными инфекциями. Горизонтальной прерывистой линией показано среднее значение данного показателя у здоровых детей.



\*- достоверное отличие от аналогичного показателя у здоровых детей

При сочетании коклюша с вирусной инфекцией также наблюдается снижение продукции ИФН $\gamma$  вплоть до 5 недели заболевания. Однако при сочетании коклюша с микоплазменной инфекцией индуцированная продукция ИФН $\gamma$  находилась примерно на уровне здоровых детей.

Таким образом, несмотря на то, что присоединение других респираторных инфекций к коклюшу влияет на динамику продукции ИФН $\gamma$ , резкое снижение индуцированной продукции ИФН $\gamma$  действительно является наиболее устойчивым изменением в цитокиновой сети больных коклюшем.

Другим провоспалительным цитокином, индуцированная продукция которого снижена, является ФНО $\alpha$  (табл.3). Спонтанная продукция данного цитокина повышена при всех клинических формах заболевания. Согласно современным представлениям, данное изменение указывает на высокую текущую активность процессов, регулируемых данным цитокином. Сочетание повышенной спонтанной со сниженной индуцированной продукцией ФНО $\alpha$  показывает большое значение процессов, в которых участвует ФНО $\alpha$  при коклюше, а также что данное звено цитокиновой сети у больных близко к истощению.

Спонтанная продукция таких провоспалительных цитокинов как ИЛ-6 и ИЛ-8 (табл.3) повышается с ухудшением состояния больного.

Табл. 3 Спонтанная и индуцированная продукция ряда провоспалительных цитокинов при коклюше разной степени тяжести (пг/мл;  $M \pm tm$ )

Клинические формы коклюша	продукция ФНО $\alpha$		продукция ИЛ-6		продукция ИЛ-8	
	индуц	спонт	индуц	спонт	индуц	спонт
Легкая <b>n = 31</b>	<b>849 **</b> $\pm 181$	<b>94 **</b> $\pm 60$	5664 $\pm 2441$	45 $\pm 46$	3121 $\pm 2447$	130 $\pm 103$
средней тяжести без осложнений <b>n = 29</b>	<b>957 **</b> $\pm 192$	<b>93 **</b> $\pm 36$	7927 $\pm 2676$	<b>260 *</b> $\pm 241$	3284 $\pm 1146$	<b>344 *</b> $\pm 168$
средней тяжести с осложнением бронхитом или пневмонией <b>n = 20</b>	1553 $\pm 796$	<b>90 **</b> $\pm 63$	7324 $\pm 2379$	182 $\pm 254$	3451 $\pm 1598$	530 $\pm 570$
норма <b>n = 34</b>	1799 $\pm 284$	7 $\pm 5$	6401 $\pm 1135$	68 $\pm 99$	3298 $\pm 206$	206 $\pm 57$

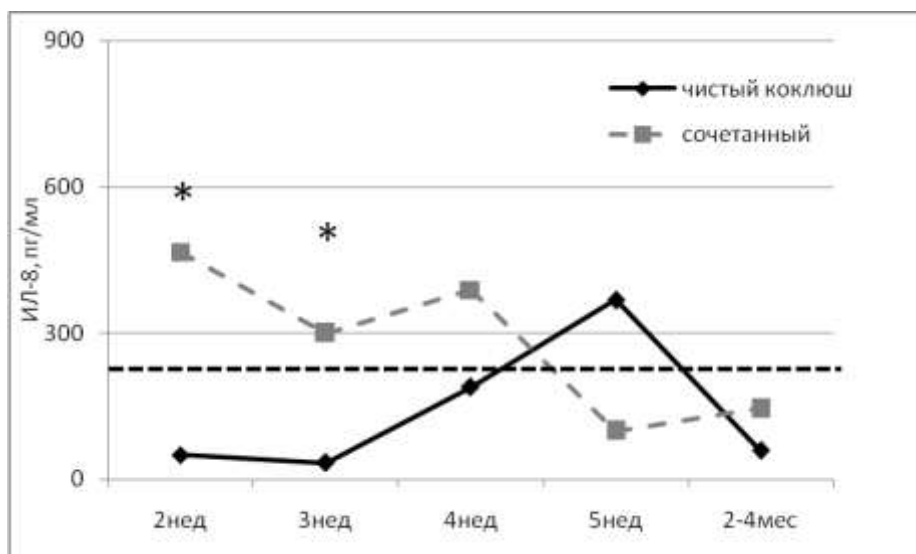
\* - значимое отличие от показателя при легкой форме коклюша

\*\* - значимое отличие от нормы

Однако детальное изучение спонтанной продукции ИЛ-8 в динамике заболевания коклюшем показало, что при «чистом» коклюше и при сочетании его с дру-

гими респираторными инфекциями изменение продукции данного цитокина происходит неодинаково (рис.3).

Рис. 3. Спонтанная продукция ИЛ-8 в культуре клеток цельной крови при «чистом» коклюше и коклюше, сочетанном с другими инфекциями (средние значения; пг/мл). Горизонтальной прерывистой линией дана средняя величина показателя у здоровых детей.



\*- достоверное отличие от аналогичного показателя у детей с «чистым» коклюшем

Известно, что коклюшный токсин подавляет миграцию лейкоцитов к очагу инфекции, и действительно, нам удалось показать, что только при сочетанном течении коклюша спонтанная продукция ИЛ-8 повышена по 4 неделю заболевания. При «чистом» коклюше активное выделение хемокина ИЛ-8 на ранних сроках заболевания подавлено и только с 4 недели от начала заболевания регуляция миграции восстанавливается.

ИЛ-17 также играет большую роль в регуляции миграции нейтрофильных гранулоцитов в очаг воспаления, индуцируя продукцию СС- и СХС- хемокинов, поэтому можно ожидать, что присоединение других респираторных инфекций к коклюшу или осложнение пневмонией или бронхитом течения коклюша будет приводить к подъему продукции данного цитокина.

При сочетанном течении коклюша отмечается ранний подъем продукции ИЛ-17, в то время как динамика продукции ИЛ-17 при коклюше, протекающем без присоединения каких-либо респираторных инфекций, носит довольно монотонный характер.



Продукция ИЛ-17 повышена на всех сроках заболевания по сравнению со здоровыми детьми. Наиболее высокая продукция данного цитокина была отмечена у детей, переносящих коклюш в сочетании с микоплазменной инфекцией (табл.4).

Табл.4. Изменение активности Th17 при сочетании коклюша с другими респираторными инфекциями ( $M \pm tm$ ).

Группы детей	Количество детей	Индукцированная продукция ИЛ-17 (пг/мл)
Коклюш	n=19	476±323
Коклюш и микоплазменная инфекция	n=19	574±287*
Коклюш и вирусная инфекция	n=13	298±145
Здоровые дети	n=20	243 ± 78

\*- достоверное отличие от аналогичного показателя у здоровых детей

У детей, переносящих коклюш легкой или средней степени тяжести, уровень индуцированной продукции ИЛ-17 достоверно не отличался от такового у здоровых детей. Повышение данного показателя отмечалось только при осложненном течении данного заболевания (табл. 5).

Табл. 5. Изменение активности Th17 при разных формах коклюша ( $M \pm tm$ ).

Клиническая форма коклюша	Количество детей	Индукцированная продукция ИЛ-17, пг/мл
Легкая	n=9	438±317
Средняя	n=31	348±148
С осложнениями	n=20	610±339*
Здоровые дети	n=20	243 ± 78

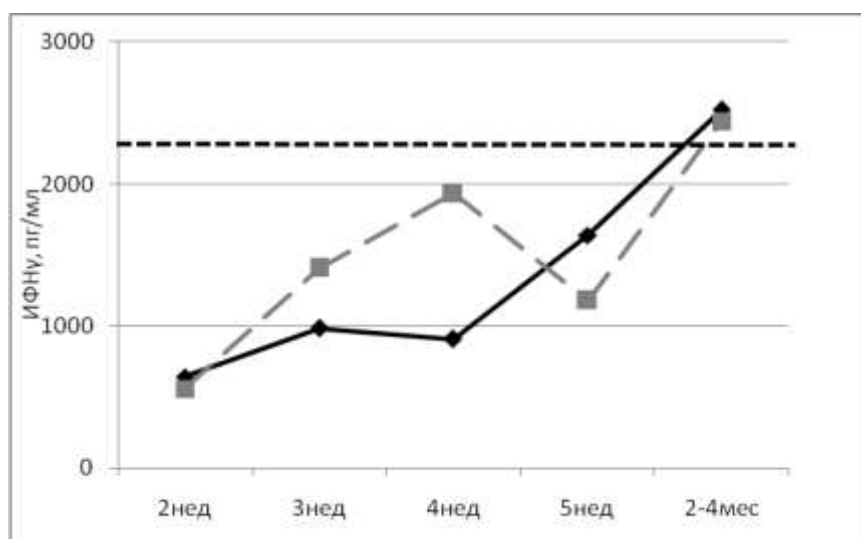
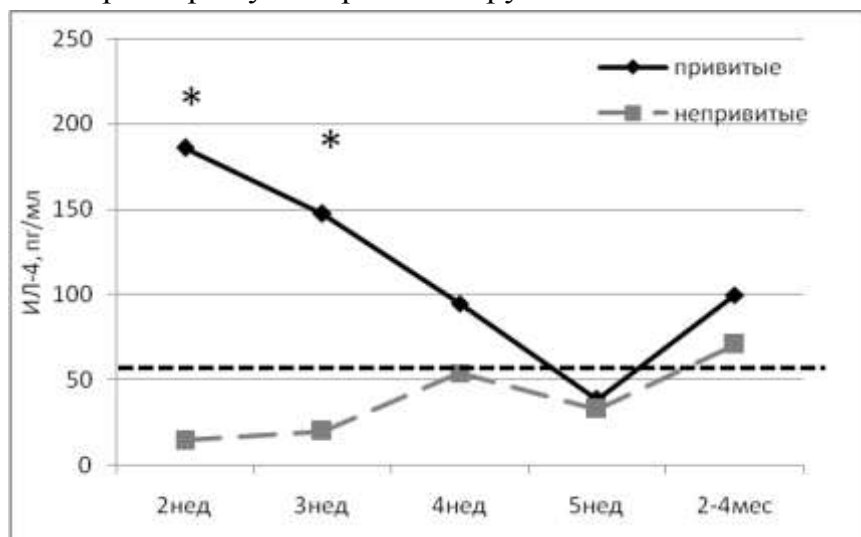
\*- достоверное отличие от аналогичного показателя у здоровых детей

Таким образом, изменения в продукции ИЛ-17 при коклюше связаны скорее с сочетанием коклюша с другими респираторными инфекциями или осложнением данного заболевания бронхитом или пневмонией.

Помимо общих изменений в цитокиновой сети больных коклюшем наблюдаются некоторые различия между ранее привитыми от коклюша и непривитыми. Различия касаются цитокинов, регулирующих гуморальный ответ.

Для изучения баланса активности Т-хелперов 1 и 2 типа мы проанализировали динамику продукции ИЛ-4 и ИФН $\gamma$  в зависимости от прививочного анамнеза детей.

Рис.4. Продукция ИЛ-4 и ИФН $\gamma$  у больных коклюшем детей с разным прививочным анамнезом. Горизонтальной прерывистой линией показано среднее значение параметров у контрольной группы.



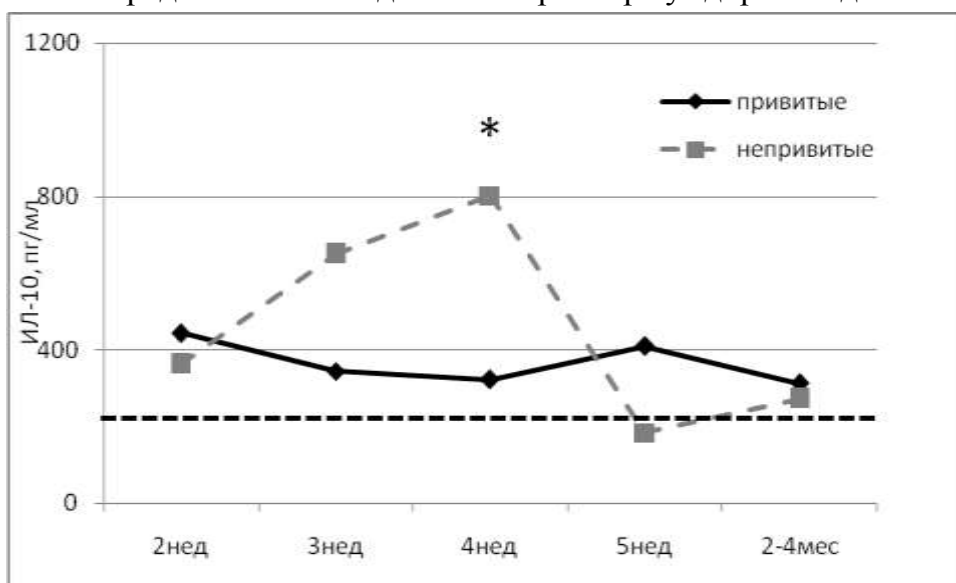
\* достоверное отличие от аналогичного показателя у непривитых детей

У привитых детей на 2-4 неделе от начала заболевания отмечена высокая продукция ИЛ-4, что связано, по нашему мнению, с активным вторичным иммунным ответом на коклюшную инфекцию. У непривитых детей индуцированная продукция ИЛ-4 постепенно нарастает. Характер динамики продукции ИФН $\gamma$  у обеих групп больных сходен, продукция этого цитокина снижена у всех больных на всех сроках заболевания (рис.4).

Таким образом, у больных, ранее привитых против коклюша, иммунный ответ с первых дней заболевания развивается как Th2 регулируемый. У непривитых детей переход к Th2 регулируемому ответу происходит не ранее 4 недели заболевания.

Еще одним цитокином, регулирующим гуморальный ответ, является ИЛ-10. На 4 неделе заболевания у непривитых детей регистрируется всплеск продукции ИЛ-10, причем как спонтанной, так и индуцированной. В то же время у привитых детей продукция этого цитокина носит монотонный характер (рис.5).

Рис.5. Индуцированная продукция ИЛ-10 у детей, переносящих коклюш, в зависимости от прививочного анамнеза. Горизонтальной прерывистой линией показано среднее значение данного параметра у здоровых детей



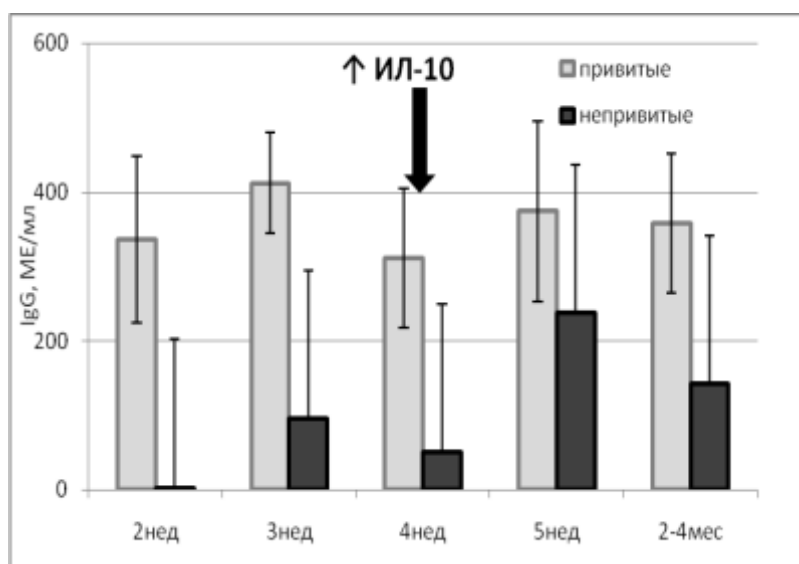
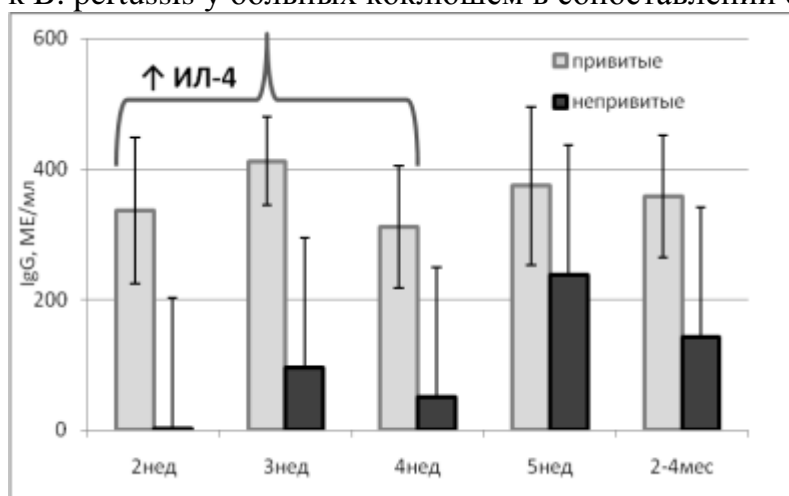
\* достоверное отличие от аналогичного показателя у непривитых детей

Исходя из способности ИЛ-10 переключать иммунную систему с преимущественно клеточного ответа (Th1 регулируемого) на преимущественно гуморальный (Th2 регулируемый), можно предположить, что отличия, наблюдаемые у непривитых детей, связаны именно с этим. Вероятно, резкое увеличение активности Т-лимфоцитов, продуцирующих ИЛ-10, предваряет важное изменение в реализации гуморального иммунного ответа – переход к синтезу IgG-антител.

При сравнении динамики специфических антител к *B.pertussis* и продукции цитокинов, регулирующих гуморальный иммунный ответ, нами было отмечено,

что ИЛ-4 и ИЛ-10 принимают активное участие в регуляции специфического иммунного ответа на коклюшную инфекцию.

Рис. 6. Изменение сывороточной концентрации специфических IgG-антител к *B. pertussis* у больных коклюшем в сопоставлении с продукцией ИЛ-4 и ИЛ-10.



На рис.6 показано, что продукция специфических IgG антител на 2-4 неделе от начала заболевания у привитых детей сопровождается высоким уровнем продукции ИЛ-4. В то же время активная продукция антител данного класса у непривитых детей начинается с 4 недели и сопровождается высоким уровнем продукции ИЛ-10.

Таким образом, на течение коклюша и, соответственно, на изменения показателей активности иммунной системы оказывают влияние прививочный анамнез и сочетания коклюша с другими респираторными инфекциями.

У привитых детей с ранних сроков заболевания повышенная активность Th2 выявлялась по повышенной продукции ИЛ-4, тогда как у непривитых активность

Th2 возрастала позже. Напротив, у непривитых выявлялся всплеск продукции ИЛ-10 на 4 неделе от начала заболевания, в то время как у привитых динамика продукции ИЛ-10 в течение заболевания монотонна.

Устойчивое снижение способности лимфоцитов больного коклюшем к продукции ИФН $\gamma$  способствует присоединению других респираторных инфекций, которое существенно влияет на цитокиновый профиль иммунного ответа.

Повышение спонтанной продукции провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8) является типичным изменением при коклюше. Однако, если коклюш сочетается с другими инфекциями, спонтанная продукция ИЛ-8 повышена начиная с ранних стадий заболевания, а при «чистом» коклюше воздействие коклюшного токсина приводит к тому, что продукция ИЛ-8 повышается на поздних стадиях заболевания. Кроме того нам удалось показать, что повышение уровня спонтанной продукции ИЛ-6, ИЛ-8 тем сильнее, чем выше тяжесть заболевания.

## Выводы

1. Цитокиновый профиль больных коклюшем отличается от такового у здоровых детей. При коклюше индуцированная продукция ряда цитокинов (в основном, провоспалительных) снижена, спонтанная повышена.
2. Снижение продукции ИФН $\gamma$  лимфоцитами больных является характерной, длительно сохраняющейся особенностью функционирования цитокиновой сети при коклюше. Вероятно, это является проявлением интенсивной реализации гуморального ответа на возбудитель коклюша по Th2 типу.
3. Повышение спонтанной продукции провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8) у больных коклюшем свидетельствует об активной реакции иммунной системы на коклюшную инфекцию и другие респираторные инфекции, сочетающиеся с ней. Для ИЛ-6 и ИЛ-8 такая реакция усиливается с углублением тяжести заболевания.
4. Цитокиновая регуляция специфического гуморального ответа на коклюшную инфекцию имеет особенности, связанные с прививочным анамнезом больных. У ранее привитых детей активность Th2 высока с первых недель заболевания, а у непривитых начинает преобладать на поздних сроках заболевания.
5. Присоединение микоплазменной инфекции к коклюшу наиболее сильно изменяет цитокиновый профиль, наблюдаемый у больных. При этом варианте заболевания наблюдается самая высокая продукция ИЛ-8, ИЛ-17 на ранних сроках и наиболее быстрая нормализация продукции ИФН $\gamma$  на поздних сроках. Повышенная концентрация IgE в крови больных также характерна для сочетания коклюша с микоплазменной инфекцией.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Характер изменений в цитокиновой сети при коклюше. // Медицинская иммунология, 2006, том 8, № 2-3. с. 298 (Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В., Попова О.П)
2. Изменения в цитокиновой сети при коклюше и его сочетаниях с другими инфекциями. // Медицинская иммунология, 2007, том 9, № 2-3, с. 231-232 (Котелева С.И., Федорова И.М., Капустин И.В., Попова О.П.)
3. Влияние сопутствующей микоплазменной инфекции на цитокиновый статус больных коклюшем. // Российский иммунологический журнал, 2008, т.2, №2-3, с. 251 (Котелева С.И., Федорова И.М., Капустин И.В., Рамазанова З.К)
4. Цитокиновый статус больных коклюшем, соответствующий различным стадиям и формам заболевания. // Российский иммунологический журнал, 2008, т.2, №2-3, с. 262 (Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В., Попова О.П., Бляхер М.С.)
5. Динамика антител к *V. pertussis* и продукция цитокинов у детей, больных коклюшем. // Медицинская иммунология, 2009, том 11, № 4-5, с. 388 (Котелева С.И., Федорова И.М., Капустин И.В., Попова О.П., Скирда Т.А.)

### Список сокращений

ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-23	– интерлейкины
ИФН $\alpha$ , ИФН $\gamma$	– интерфероны - альфа и - гамма
КТ	– коклюшный токсин
ЛПС	– липополисахарид
РСВ	– респираторно-синцитиальный вирус
ФГА	– фитогемагглютинин
ФМА	- форболмиристатацетат
ФНО $\alpha$	– фактор некроза опухоли альфа
CD4, CD8, CD19, CD16 56	– маркеры основных субпопуляций лимфоцитов крови
IgG, IgM, IgA, IgE	– иммуноглобулины классов G, M, A, E
Th1, Th2, Th17	– Т-хелперы 1, 2 типа и продуцирующие ИЛ-17
Tr1, Treg	– субпопуляции Т-регуляторных клеток