

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК 616.9-07-092-037

М. В. Шипилов, В. В. Иванов

УРОВЕНЬ ИНТЕРФЕРОНА- γ ПРИ ГРИППЕ А

ООО «Смоленскмединвест», Смоленск

Одними из важнейших факторов, осуществляющих межклеточные взаимодействия для поддержания клеточного гомеостаза, являются интерфероны (IFN). IFN относят к цитокинам, и они входят в состав биологической мультисистемы — «цитокетиновой сети». Не подлежит сомнению факт важнейшей роли IFN в осуществлении врожденной неспецифической локальной и системной реакции организма в ответ на внедрение и репликацию вирусов [1–3].

Из известных на сегодняшний день типов IFN наиболее важное значение имеет IFN- γ , продукция которого может осуществляться практически всеми клетками человеческого организма (при соответствующей стимуляции), но чаще — активированными Th1-лимфоцитами, реже — В-лимфоцитами, НК-клетками, моноцитами/макрофагами. Данный цитокин способствует активации клеток моноцитарно-макрофагального звена, НК-клеток, Т- и В-лимфоцитов, что приводит к усилению их цитотоксичности, продукции молекул адгезии, а также к запуску целого каскада провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [1–3]. Последнее подтверждается исследованием на модели инфекционно-токсического шока мышей, характеризующегося изначально тяжелым течением, когда исследователями было определено то, что IFN- γ усиливает выработку клетками-продуцентами интерлейкина-4, интерлейкина-10, интерлейкина-12, интерлейкина-17, эотаксина, так как после введения мышам антител к IFN- γ уровень исследуемых факторов в крови статистически значимо уменьшался [4].

Предположение о том, что при утяжелении заболевания усиливается продукция IFN- γ активированными Th1-лимфоцитами, подтверждается недавним исследованием сыворотки крови больных гриппом А/Н1N1/2009, когда при не отличающейся от нормы концентрации IFN- γ в периферической крови больных среднетяжелой формой гриппа А/Н1N1/2009 было выявлено достоверное повышение его уровня при тяжелом течении заболевания, в связи с чем авторы посчитали этот повышенный уровень IFN- γ отличительным признаком (критерием) тяжелого течения гриппа А/Н1N1/2009 [5]. Однако в другом исследовании отсутствовали статистически значимые различия концентрации IFN- γ как в сравнении среднетяжелого и тяжелого течения гриппа

A/H1N1/2009, так и с контролем [6]. В доступной нам литературе не оказалось работ по исследованию уровня IFN- γ у больных гриппом A/H3N2.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня IFN- γ в периферической крови больных гриппом А разных типов (A/H1N1/2009, A/H3N2) среднетяжелой и тяжелой формой заболевания в остром и реконвалесцентном периодах.

Материалы и методы исследования. Обследовано 18 больных гриппом A/H1N1/2009 средней степени тяжести в возрасте 15–54 лет (9 мужчин и 9 женщин), у трех из которых в качестве фоновой патологии был выявлен хронический бронхит. Другой фоновой патологии обнаружено не было. Также были обследованы 10 больных в возрасте 19–61 лет (6 мужчин и 4 женщины) с тяжелым течением гриппа A/H1N1/2009 с летальным исходом, причиной которого была двусторонняя субтотальная/тотальная пневмония с развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС).

Помимо этого, была исследована сыворотка крови 17 больных гриппом A/H3N2 в форме средней тяжести в возрасте 16–51 лет (8 мужчин и 9 женщин) в те же периоды заболевания. У одной обследованной пациентки, больной гриппом A/H3N2, в качестве сопутствующего заболевания был выявлен хронический пиелонефрит (вне обострения), у двух — хронический бронхит; другой фоновой патологии обнаружено не было.

Степень тяжести гриппа А оценивали по выраженности интоксикационного и катарального синдромов. При среднетяжелой форме гриппа А заболевание начиналось остро, температура тела повышалась в пределах 38–40°C, симптомы интоксикации и катаральные явления были умеренно выражены. Длительность лихорадочного периода составляла 4–5 дней. Тяжелая форма гриппа характеризовалась внезапным началом заболевания, высокой (39,5°C и более) лихорадкой, резко выраженными симптомами интоксикации (адинамией, резкой головной болью, головокружением, обморочным состоянием, анорексией, рвотой, судорогами, сердечно-сосудистыми нарушениями). Данная форма осложнялась двусторонней пневмонией с развитием ОРДС с последующим (наступившим на 5–17 дни болезни) летальным исходом.

В качестве противовирусной терапии больным среднетяжелой формой гриппа A/H1N1/2009 (n = 15) и гриппа A/H3N2 (n = 14) назначали осельтамивир по 75 мг 2 раза в сутки внутрь в течение 5 дней. Лечение осельтамивиром получали также 9 из 10 больных с тяжелым течением гриппа A/H1N1/2009 в той же дозе и длительностью курса. В лечении пациентов с тяжелым течением гриппа A/H1N1/2009 использовали респираторную поддержку в режиме по давлению аппаратом для искусственной вентиляции легких «Ньюпорт 150». Помимо этого, всем больным гриппом проводилась патогенетическая (дезинтоксикационная, жаропонижающая, антигистаминная, отхаркивающая) терапия согласно общепринятым схемам.

Кровь для исследования забирала в остром периоде (1–2 день болезни) и в периоде реконвалесценции (на 7–9 день болезни). Диагноз был подтвержден с помощью метода полимеразной цепной реакции или реакции непрямой гемагглютинации (выявлением специфических антител с ростом их титра в 4 и более раз). Уровень фактора определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа коммерческими тест-системами ЗАО «Вектор-Бест», Россия [7].

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 критерия согласия Шапиро—Вилкса, одного из самых мощных критериев нормальности [8]. Из всех групп исследованных пациентов нормальным оказалось распределение лишь концентрации IFN- γ у больных гриппом А/Н3N2 в периоде реконвалесценции (критерий Шапиро—Вилкса составил $p = 0,923$). Таким образом, гипотеза нормальности распределения не была выполнена в большинстве вариационных рядов, что согласуется с литературными данными, свидетельствующими о том, что только 20% распределений количественных признаков, встречающихся в медико-биологических исследованиях, являются приближенно нормальными [9].

В связи с невыполнением гипотезы нормальности распределения большинства вариационных рядов известные критерии парных сравнений (t -критерий Стьюдента и точный критерий Фишера для сравнения дисперсий) не могли быть применены, и в соответствии с рекомендациями [9] 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. Также был определен интервал [25-й; 75-й перцентили] [8, 9]. Между собой выборки сравнивали с помощью непараметрических критериев Вилкоксона—Манна—Уитни (ВМУ) — рангового критерия, хорошо приспособленного для анализа малых выборок и робастного к виду закона их распределения, а также двухвыборочного критерия Колмогорова—Смирнова (КС) [8]. Уровень значимости при проверке всех статистических гипотез — $p < 0,05$ (доверительная вероятность $> 0,95$).

Контролем служила кровь 17 здоровых доноров в возрасте 19–40 лет ($Me = 0,1$ пг/мл). Полученные нами значения IFN- γ контрольной группы лиц согласуются со средним показателем, полученным при обследовании сыворотки крови 68 здоровых доноров фирмой-производителем тест-систем ЗАО «Вектор-Бест»: 2 пг/мл (с вариацией от 0 до 10 пг/мл).

Результаты исследования. Сравнительная характеристика динамики концентрации IFN- γ в сыворотке крови больных гриппом А (в остром периоде и в периоде реконвалесценции) представлена в таблице 1. В результате проведенного исследования выявлено достоверное повышение концентрации IFN- γ в остром периоде (КС $p < 0,05$) и в периоде реконвалесценции (КС $p < 0,001$) у больных среднетяжелой формой гриппа А/Н1N1/2009 по сравнению с контролем. Аналогичные результаты, в виде статистически значимого повышения концентрации IFN- γ в остром периоде (ВМУ, КС $p < 0,05$) и в периоде реконвалесценции (ВМУ, КС $p < 0,05$) по сравнению с контролем, были получены и при гриппе А/Н3N2.

Кроме того, уровень IFN- γ в остром периоде у больных с тяжелым течением гриппа А/Н1N1/2009 был достоверно выше не только по сравнению с контролем (КС $p < 0,05$), но и со среднетяжелым течением гриппа А/Н1N1/2009 (КС $p < 0,001$), что согласуется с данными литературы [5].

Изменение уровня IFN- γ в течение заболевания при гриппе А носило разнонаправленный характер. Так, при гриппе А/Н1N1/2009 было отмечено достоверное снижение концентрации цитокина к периоду реконвалесценции (КС $p < 0,001$). При гриппе

A/H3N2 в течение всего заболевания концентрация IFN- γ сохранялась стабильно высокой (ВМУ, КС $p > 0,05$).

Таблица 1. Сравнительная характеристика уровня IFN- γ у больных гриппом А

Группы больных	Медиана IFN- γ [25-й; 75-й перцентили], пг/мл	
	Острый период	Период реконвалесценции
Грипп А/Н1N1/2009 (среднетяжелое течение)	1,1 [0,27; 1,93]**#, n = 17	0,15 [0,04; 0,27]*#, n = 16
Грипп А/Н1N1/2009 (тяжелое течение /умершие/)	1,3 [0,33; 2,31]#, n = 10	—
Грипп А/Н3N2	8,7 [2,17; 15,53]#, n = 13	6,3 [1,51; 11,02]#, n = 13
Контроль, пг/мл	0,1 [0,02; 0,18], n = 17	

Примечание: * — достоверные различия показателя в динамике заболевания (КС $p < 0,001$); ** — достоверные различия между группой больных с тяжелым и среднетяжелым течением гриппа А/Н1N1/2009 в остром периоде заболевания (КС $p < 0,05$); # — достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$); n — число обследованных пациентов.

В остром периоде и периоде реконвалесценции у больных исследуемых групп самый низкий статистически значимый уровень IFN- γ — хотя и больший по сравнению с контролем — был у пациентов со среднетяжелым течением гриппа А/Н1N1/2009 в сравнении с больными гриппом А/Н3N2 (ВМУ, КС $p < 0,05$).

Обсуждение. В результате данного сравнительного исследования определено повышение уровня IFN- γ у всех групп больных гриппом А по сравнению с контролем, что подтверждает активное участие цитокина в патогенезе данного заболевания; ведь именно индукция IFN- γ является основным (ядерным) звеном в защите клеток при гриппе, что связано с усилением резистентности клеток организма к вирусу гриппа, повышением клеточно-опосредованного иммунитета, активацией макрофагального звена, повышением презентации антигенов [1, 3, 4–6].

Однако при этом были выявлены следующие особенности иммунного ответа у больных разными типами вируса гриппа А. Так, при гриппе А/Н3N2 была выявлена наиболее высокая концентрация фактора в остром периоде без статистически значимого снижения его уровня к периоду реконвалесценции. Иная ситуация наблюдалась при гриппе А/Н1N1/2009. При среднетяжелом течении данного заболевания отмечался более низкий по сравнению с гриппом А/Н3N2 уровень IFN- γ уже в начале заболевания (хотя и превышающий норму). В последующем отмечено достоверное снижение концентрации к периоду реконвалесценции гриппа А/Н1N1/2009, приближающееся практически к нормальным значениям.

Таким образом, у больных гриппом А/Н3N2 концентрация IFN- γ в сыворотке крови в остром периоде заболевания достоверно превосходила соответствующий уровень IFN- γ при гриппе А/Н1N1/2009 (как среднетяжелого, так и тяжелого течения) в 7–8 раз, что, возможно, объясняется более выраженной активностью Th1-лимфоцитов по выработке данного белка. Еще больший Th1-ответ организма в виде повышенной в 42 раза

концентрации IFN- γ был выявлен в реконвалесцентном периоде среднетяжелого гриппа А/Н3N2 в сравнении с соответствующим показателем при гриппе А/Н1N1/2009.

Достоверное повышение уровня IFN- γ при тяжелом течении гриппа А/Н1N1/2009 в сравнении с его среднетяжелым течением, выявленное в настоящем исследовании, подтверждается некоторыми литературными данными [5]. По нашему мнению, статистически значимый более высокий уровень IFN- γ при тяжелом течении гриппа А/Н1N1/2009 (в сравнении с его среднетяжелым течением) может свидетельствовать о возрастающей роли цитокина при утяжелении состояния, требующей еще большего его количества для участия в каскаде цитокиновых реакций и реализации противовирусного иммунитета. Однако и этот уровень (гораздо меньший в сравнении с гриппом А/Н3N2) оказывается недостаточно защитным, что и может служить одной из причин летального исхода.

В связи с тем, что уровень IFN- γ является центральным звеном в защите клеток от гриппозной инфекции [1], а также с особенностями его изменения в зависимости от типа вируса гриппа А, выявленными в настоящем исследовании, результаты концентрации данного цитокина в сыворотке крови в норме и у больных гриппом были нами использованы в качестве одного из важных критериев прогноза в разработанной экспертной системе «Экспресс-диагностика и прогноз течения острых респираторных вирусных инфекций» [10].

Литература

1. Деева Э.Г. Грипп. На пороге пандемии: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 208 с.
2. Иванов А.А., Гладких О.П., Кузнецова А.В., Данилова Т.И. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии // Молекулярная медицина. 2005. № 2. С. 16–21.
3. Нагоев Б.С., Нагоева М.Х., Камбачокова Э.А. О роли цитокинов в регуляции иммунной системы при инфекционных заболеваниях / Матер. III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 28–30 марта 2011 г.) // Инфекционные болезни. 2011. Т. 9. Приложение № 1. С. 260.
4. Tilahun A. Y. Interferon gamma-dependent intestinal pathology contributes to the lethality in bacterial superantigen-induced toxic shock syndrome // PLoS One. 2011. Vol. 6, N 2. P. 16764.
5. Bermejo-Martin J. F., Ortiz de Lejarazu R., Pumarola T. et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. // Crit Care. 2009. Vol. 13(6). P. 201.
6. Hagan N., Slavcovici A., Gongana D. N. et al. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection // Crit Care. 2010. Vol. 14 (6). P. 203.
7. Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А., Тимофеева Н.В., Рукавишников М.Ю. Определение цитокинов методом иммуноферментного анализа // Информационный бюллетень «Новости “Вектор-Бест”». 2004. Т. 4, № 34. С. 3–7.
8. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика: для инженеров и научных работников. М.: Физматлит, 2006. 816 с.
9. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.
10. Усков А.А., Иванов В.В., Шипилов М.В. Интерфейс экспертной системы «Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ». Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам РФ № 2011615981 от 02.08.2011 г.

Статья поступила в редакцию 20 марта 2012 г.