

УДК 616.248-052.7.5+616.83

СТАН ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ У ДІТЕЙ В ПРИСТУПНОМУ ПЕРІОДІ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ В ПРОЦЕСІ ВАЛКІОН-ТЕРАПІЇ

Цимбаліста О.Л., Березна Т.Г., Балан У.В.

*Івано-Франківська державна медична академія; Обласна клінічна лікарня, м. Івано-Франківськ***Ключові слова:** бронхіальна астма, діти, терапевтичне лікування

Вступ. Сучасні досягнення в розумінні імунологічних механізмів запалення при алергічних захворюваннях дають можливість для розробки нових терапевтичних стратегій лікування atopічних захворювань. Тому в останні роки велика увага приділяється вивченню патогенезу atopії, ролі і взаємозв'язків імунокомпетентних клітин, зокрема Т і В лімфоцитів, еозинофілів, моноцитів/макрофагів та опасистих клітин. Кооперативні зв'язки та функція цих ефекторних клітин забезпечуються великою кількістю цитокінів. Поняття "цитокіни", які виконують роль гормонів імунної системи, об'єднує в собі ряд біологічно активних речовин. До них відносяться інтерлейкіни, інтерферони, колонієстимулюючі фактори, фактори некрозу пухлин та інші. Відкриття двох субтипів Th (Th1 та Th2), які продукують цитокіни антагоністи (відповідно IFN- γ та IL-4) було значним кроком вперед в розумінні імунної відповіді при atopії. В даний час встановлена функціональна недостатність Th1-клітинної ланки, що веде до недостатнього синтезу IFN- γ , який в нормі пригнічує продукцію IgE. Крім того, надмірна стимуляція антигенами (в тому числі і вільними радикалами кисню) макрофагів приводить до синтезу ними факторів гіпореактивності, які додатково пригнічують синтез IFN- γ . В зв'язку з цим переважає Th2-популяція клітин, які продукуючи IL-4, посилюють диференціювання В-лімфоцитів в плазматичні клітини, останні в свою чергу синтезують IgE. Окрім факторів гіпореактивності макрофаги продукують основний індикатор вираженості запального процесу IL-1 α . Таким чином, про плин atopічного запалення можна судити по найінформативніших цитокінах – IL-1 α , IL-4, IFN- γ [4, 6]. Прооксидантні зміни найбільше виражені в слизовій оболонці бронхів. В дихальних шляхах найпотужнішими продуцентами супероксидного аніону (СОА), який є попередником всіх вільних радикалів кисню (в тому числі і синглетного кисню), є альвеолярні макрофаги. Паралельно з ними посилюють місцеву генерацію СОА рециркулюючий пул лейкоцитів, еозинофіли, нейтрофіли та моноцити. При цьому концентрація СОА збільшується в 6-7 разів під час загострення запального процесу в дихальних шляхах в порівнянні з нормою. Активні форми кисню (АФК) – СОА, перекис водню, гідроксильний радикал, синглетний кисень – мають ряд негативних ефектів, зокрема: бронхоконстрикторний, викликають гіперреак-

тивність бронхів та гіпертрофію гладкої мускулатури, ушкоджуючий вплив на епітелій бронхів, гіперкринію, посилюють викид опасистими клітинами гістаміну. АФК посилюють також синтез В-лімфоцитами IgE і одночасно пригнічують активність Т-супресорів, а це в свою чергу знову сприяє синтезу IgE, створюючи замкнене коло. Надмірне нагромадження вільних радикалів кисню, недоокислених продуктів обміну ліпідів веде до активації та руйнування мембран імунокомпетентних клітин [1, 4, 5]. Результатом є вивільнення арахідонової кислоти і утворення бронхоконстриктивних ейкозаноїдів. Зокрема, LTB₄, діючи на еозинофіли, знову сприяє генерації попередника всіх радикалів СОА, створюючи друге замкнене коло. Така реверсія продукції СОА продовжується і після періоду загострення бронхіальної астми, так як в цей час різко знижується антиоксидантний захист [3]. Це в свою чергу сприяє зсуву рівноваги IL-4- IFN- γ в сторону посиленого синтезу IL-4, що стимулює утворення IgE [9]. Новим напрямком в антиоксидантній терапії є розробка антиоксидантів з прямим механізмом дії та можливістю їх місцевого застосування. Антиоксидантна система в організмі представлена неферментативними (вітамін А, Е, С) та ферментативними сполуками (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза). Регенерація їх потребує тривалого часу і не здатна забезпечити потреби організму в разі хронічного впливу вільнорадикальних сполук. Крім цього, більшість антиоксидантних препаратів усувають кінцеві продукти ПОЛ (малоновий диальдегід) і тому неефективні. В даному випадку перевага надається прямим антиоксидантам, що усувають попередника всіх радикалів – СОА, тобто першу ланку запуску запального процесу. Отже, такі літературні дані обґрунтовують доцільність використання патогенетичного методу лікування бронхіальної астми, як валкіон-терапії. Валкіон-терапія - це новий перспективний метод лікування та профілактики захворювань, викликаних порушенням окисно-відновного балансу організму і збільшенням кількості вільних радикалів. В активаційній камері апарату "Valkion" (фірми "Polivalk", Швеція) кисень, який міститься в повітрі, під дією спеціального джерела світла і відповідного фотосенситайзера перетворюється в синглетний кисень. Молекула кисню живе в синглетному стані обмежений час, після чого вона розпадається і відновлюється до нормального

стану. Цей процес синглетно-триплетно-дипольного переходу супроводжується виділенням специфічних видів енергії (синглетно-кисневих факторів), які власне і спричиняють низку біохімічних та біофізичних процесів, спрямованих на нормалізацію обмінно-окислювальних реакцій в організмі людини. В результаті в першу чергу здійснюється детоксикація організму, відновлення антиоксидантного стану шляхом складних зрушень метаболізму. Клінічним ефектом валкіон-терапії є покращення і часткове відновлення бронхіальної прохідності, зниження частоти і тяжкості приступів задухи. Окремі повідомлення вказують на безпосередній позитивний вплив синглетно-кисневих факторів на клітинну та гуморальну ланки імунітету. Тому всі перераховані механізми дії валкіон-терапії в кінцевому результаті покращують якість життя дитини, підвищують можливість її соціальної адаптації [7, 8].

Матеріали і методи. Для визначення змін цитокінового профілю в приступному періоді бронхіальної астми у дітей в процесі валкіон-терапії було обстежено і проліковано 56 дітей віком від 5,5 до 14 років. За методикою лікування їх було поділено на дві групи. До першої групи належали діти, що в процесі лікування крім традиційної терапії отримували валкіон-терапію (32 дитини). Другу групу склали 24 дитини, яким було призначене виключно традиційне лікування. Групою порівняння були 16 здорових дітей. Сеанси валкіон-терапії проводились два рази на день з інтервалом в 4 години і складались із вживання 100 мл активованої води і 10 хвилинного вдихання активованого повітря, на курс 10-12 процедур. Визначення сироваткового вмісту цитокінів здійснювалось з використанням наборів реактивів для імуноферментного аналізу фірми Diaclon (Франція) на спектрофотокolorиметричному аналізаторі "Stat Fax 303 Plus" (США "Awareness Technology, inc."). Даний метод є твердофазним імунозв'язаним імуносорбентним аналізом (ELISA), що ґрунтується на принципі "бутерброду". Мікрочарунки покриті антитілами, направлені на антигенну детермінанту (реагуючу з антитілом частину антигену) молекули антигена (IL-1 α , IL-4, IFN- γ). Аліквоти сироватки крові пацієнта інкубуються в чарунках, покритих первинними антитілами, і кожний присутній досліджуваний антиген зв'яжеться з цим антитілом. Біотинільоване вторинне антитіло (Б-Ат), направлене на іншу область молекули антигена, зв'яжеться з ним, утворюючи бутерброд. Після інкубації незв'язані Б-Ат вимиваються. Далі додають кон'югат стрептавідинпероксидази, що зв'язується в комплекс з біотином, який лишився на стінках лунок. Після додавання розчину субстрату ТМВ (ферментний субстрат) інтенсивність забарвлення буде пропорційна концентрації антигена у пробі. Вимірні значення оптичної густини для стандартів використовуються для побудови калібровочної кривої, відносно якої вираховуються невідомі проби.

Всі дослідження проводились при 22°C, для оцінки результатів ІФА використовувалась довжина хвилі 450 нм. Вимірювання проводились із дублюванням стандартів, для побудови калібровочних кривих застосовувався метод регресійного аналізу. Отримані в процесі спостереження числові дані оброблялись методами математичної статистики з розрахунком середніх величин. Для оцінки вірогідності використовувався критерій Ст'юдента. Отримані відмінності визнавались не випадковими, якщо ймовірність (p) не перевищувала 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення. При обстеженні нами групи хворих до лікування визначені наступні зміни в системі цитокінів: концентрація IL-1 α була збільшена в обох групах (в основній групі 106,63 \pm 5,74 пг/мл, в контрольній 120,64 \pm 5,39 пг/мл, p>0,05). В системі цитокінів –антагоністів IL-4 та IFN- γ відмічено вагомий зсув рівноваги в сторону IL-4 (в основній групі 20,16 \pm 1,36 пг/мл, в контрольній групі 20,69 \pm 1,48 пг/мл), концентрація якого майже в чотири рази перевищувала таку у здорових (5,29 \pm 0,55 пг/мл). Рівень IFN- γ був знижений в обох групах хворих (в основній групі до 60,46 \pm 2,36 пг/мл, в контрольній групі до 57,53 \pm 3,13 пг/мл, p>0,05). Дані зміни відображають значну вираженість запального процесу, що клінічно відповідає приступному періоду бронхіальної астми. В результаті комплексного лікування дітей в поєднанні з валкіон-терапією наступило суб'єктивне та об'єктивне покращення на 3-4 день від початку лікування. У хворих покращилось самопочуття, зменшилась задишка, частота і важкість приступів задухи, значно зменшилась кількість катаральних симптомів в легенях. Зниження активності запального процесу в легенях відображає динаміка рівня цитокінів в сироватці крові. У всіх дітей суттєво зменшився вміст IL-1 α : нормалізація наступила тільки у дітей після валкіон-терапії (від 106,63 \pm 5,74 до 26,16 \pm 2,88 пг/мл, p<0,001). Зменшення вмісту IL-1 α під впливом валкіон-терапії можна пояснити наступним чином: в нормі α -фракція IL-1 знаходиться внутрішньоклітинно, а при ушкодженні мембрани клітини виходить в інтерстиціальний простір і відповідно збільшується її концентрація в плазмі крові. Валкіон-терапія усуває ушкоджуючий вплив вільних радикалів кисню, що зменшує вихід IL-1 α з клітини. Крім цього при активації метаболізму арахідонової кислоти вільними радикалами кисню утворюються бронхоконстриктивні ейкозаноїди. Зокрема фактор активації тромбоцитів посилює генерацію IL-1 α макрофагами [2]. Під впливом валкіон-терапії зменшується ушкоджуючий вплив на мембрани клітин, а відповідно і активація метаболізму арахідонової кислоти. Все це сприяє пригніченню утворення її метаболітів, а відповідно і IL-1. Треба відмітити, що у дітей контрольної групи мало місце тільки зниження від 126,64 \pm 5,39 до 81,79 \pm 3,98 пг/мл, p<0,001). Протизапальний ефект лікування

відображає також динаміка вмісту IL-4 та IFN- γ у дітей обох груп. У всіх дітей не наступило нормалізації рівня IL-4, однак в групі де застосовувалась валкіон-терапія динаміка його є вагомішою ніж у дітей контрольної групи (від $20,16 \pm 1,36$ до $8,15 \pm 1,06$ і від $20,69 \pm 1,48$ до $12,18 \pm 1,56$ пг/мл відповідно, $p < 0,02$). Підвищення реактивності організму в процесі лікування відображає підвищення рівня IFN- γ у всіх дітей з вираженою перевагою в основній групі (від $60,46 \pm 2,36$ до $133,27 \pm 5,25$ пг/мл, $p < 0,001$). Посилення антиоксидантних властивостей організму сприяло вирівнюванню рівноваги між

вмістом IL-4 та IFN- γ в сторону збільшення концентрації IFN- γ . Ріст останнього, можливо, пов'язаний із пригніченням синтезу макрофагами фактору гіпореактивності, що при надмірній стимуляції цих клітин зменшує вміст IFN- γ , а також за рахунок зниження концентрації його антагоніста IL-4. У дітей, що отримували тільки базову терапію бронхіальної астми (контрольна група) динаміка рівня IFN- γ менше виражена (від $57,53 \pm 3,13$ до $105,84 \pm 8,02$ пг/мл, $p < 0,001$). Вміст IFN- γ у дітей основної групи після лікування суттєво перевищує результат у дітей контрольної групи ($p < 0,02$) (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни цитокінового профілю в процесі лікування, пг/мл

Цитокін	Здорові, n=16	Основна група, n=32		Контрольна група, n=24	
		До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
IL-1 α	$24,46 \pm 2,96$	$106,63 \pm 5,74$	$26,16 \pm 2,88$	$120,64 \pm 5,39$	$81,79 \pm 3,98^*$
IL-4	$5,29 \pm 0,55$	$20,16 \pm 1,36$	$8,15 \pm 1,06$	$20,69 \pm 1,48$	$12,18 \pm 1,56^{**}$
IFN- γ	$155,39 \pm 7,57$	$60,46 \pm 2,36$	$133,27 \pm 5,25$	$57,53 \pm 3,13$	$105,84 \pm 8,02^*$

Примітка: : Оцінка достовірності між обома групами після лікування:

*- ознака достовірності, $p < 0,001$

** - ознака достовірності, $p < 0,02$

Висновки. Валкіон-терапії властиві імунокорегуючі властивості, так як вона сприяє відновленню рівноваги цитокінів IL-4 та IFN- γ , шляхом зниження

вмісту IL-4, який регулює синтез IgE, а також пригнічує запальний процес, шляхом нормалізації рівня "прозапального" IL-1 α .

ЛІТЕРАТУРА

1. Земсков А.М., Земсков В.М., Караулов А.В., Золоедов В.И., Бжозовский Е., Ворновский В.И., Савенюк Н.А. Нелимфоидные механизмы иммунологические расстройств//International Journal on immunorehabilitation. - 2000.- Vol 2. - №1. - P. 161-173.
2. Зубачік В.М. Біологічна роль фосфоліпази А2 (огляд літератури) //Журнал АМН України.- 1999.-Т.5, №4.- С.627-642.
3. Изменение функциональных и биохимических показателей при лечении больных бронхиальной астмой ингаляциями газообразного супероксида / Гольдштейн Н., Реберг Г., Клефиш Ф.Р., Коркина Л. //Проблемы туберкулёза.-2000.-№2.- С.36-40.
4. Медуницын Н.В. Цитокины и аллергия//Иммунология - 1995. - №5 - С.5-8.
5. Трунов А.Н., Ефремов А.В., Тихонова О.В., Трунова Л.А. Патогенетические принципы иммунореабилитации при хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях//Аллергология и иммунология. - 2001. - Т.2. - №1. - С.105-109.
6. Douglas S Robinson. Th-2 cytokines in allergic disease//British Medical Bulletin. - 2000;56, №4. - С.956-968.
7. Frimer A.A. Singlet O2, physical-chemical aspects.-Florida. - CRC Pres Inc, 1994. - 408 p.
8. General information Investigation of the effect of Singlet Oxygen Factor on energy metabolism and on oxygen free radical generation.- K.: Ukrainian-English Special Edition, 1999. - 47 p.
9. Holgate S.T., Davies D.E. Воспаление дыхательных путей и структурные изменения их стенок – причины или следствие? //Астма.-2001. - Т.2,№2. - С.9-17.

SUMMARY

THE STATE OF CYTOKINE CHILDREN'S PROFILE IN ASSAULT PERIOD OF BRONCHIAL ASTHMA IN PROCESS OF VALKION-THERAPY

Tsymbalista O.L., Berezna T.G., Balan U.V.

With the method of immunoenzymanalyses were inspected 56 children at the age of 5,5 to 14 years old in assault period of bronchial asthma. The normal size of cytokines established in 16 healthy children. The complex treatment with using of the Valkion-therapy promoted normalization of the level IL-1 α ($p < 0,001$), what point out to decrease of inflammatory process in the organism. There were marked too a positive dynamic in the production of cytokin-antagonist IL-4 ($p < 0,001$) and IF- γ ($p < 0,001$) which have influence in the formation of Ig E. Children whose had got only traditional treatment marked the tendentious to positive shift levels IL-1 α ($p < 0,001$), IL-4 ($p < 0,001$), IF- γ ($p < 0,001$), but the normalization of these indexes did not come.

Key words: bronchial asthma, children, therapeutic treatment