**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)**

**Медико-биологический факультет**

**Нагайцева Дарья Сергеевна**

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ КРАПИВНИЦЕЙ

Выпускная квалификационная работа

Специальность:

30.05.01 «Медицинская биохимия»

Допущен к защите

"\_\_\_\_\_"\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_\_г.

Зав. кафедрой\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ /…………………/

Томск - 2020

Работа выполнена на кафедре (в НИИ, в ЛПУ, в другой организации) ……………………………………………………………………………

Научные руководители:

………………………………………..

………………………………………..

Научный консультант: ………………………………………..

Куратор от выпускающей кафедры

………………………………………

Автор работы:

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_Д.С.Нагайцева

Выпускная квалификационная работа защищена

«\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_20\_\_\_\_ г

с оценкой\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Председатель ГЭК\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Оглавление

[**Перечень условных обозначений** 4](#_Toc36385382)

[**ВВЕДЕНИЕ** 5](#_Toc36385383)

[**Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** 7](#_Toc36385384)

[**Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** 24](#_Toc36385385)

[**2.1 Анализ биохимических показателей** 25](#_Toc36385386)

[**2.1.1 Определение концентрации общего билирубина в сыворотке крови** 25](#_Toc36385387)

[**2.1.2 Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови** 26](#_Toc36385388)

[**2.1.3 Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови** 27](#_Toc36385389)

[**2.1.4 Определение активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови** 28](#_Toc36385390)

[**2.1.5 Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови** 29](#_Toc36385391)

[**2.2 Анализ иммунологических показателей** 29](#_Toc36385392)

[**2.3 Статистическая обработка данных** 31](#_Toc36385393)

[**Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** 32](#_Toc36385394)

[**ВЫВОДЫ** 34](#_Toc36385395)

[**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** 35](#_Toc36385396)

# **Перечень условных обозначений**

АЛТ – Аланинаминотрансфераза

АСТ – Аспартатаминотрансфераза

СРБ – С-реактивный белок

ХРК – хроническая рецидивирующая крапивница

ОС- острая крапивница

IgЕ – Иммуноглобулины класса Е

IgG – Иммуноглобулины класса G

# **ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность исследования**

В 21 веке крапивница представляет важную медико-социальную проблему. Актуальность проблемы обусловлена многими причинами, среди которых необходимо выделить широкую распространенность как среди взрослого, так и среди детского населения. Наиболее распространенной является острая крапивница (ОС), которая составляет 70-75% всех случаев заболевания. Каждый хотя бы раз в жизни сталкивался с ОС, при этом максимальная частота регистрируется в возрасте до 40 лет.

Необходимо отметить, что при крапивнице отмечается значительное снижение качества жизни пациентов: зуд, который сопровождает кожные высыпания, приводит к ухудшению самочувствия, часто к нарушению сна и снижению работоспособности.

**Научная новизна**

В нашей работе мы планируем получить данные, которые позволят выявить роль провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в патогенезе крапивницы.

**Цель исследования:**

Оценить особенности цитокинового профиля и биохимических показателей у пациентов с острой крапивницей и хронической рецидивирующей крапивницей.

**Задачи исследования:**

1. Оценить биохимический профиль в исследуемых группах;
2. Оценить особенности цитокинового профиля в группе пациентов с ХРК и в группе сочетания ХРК с ожирением;

# **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**Аллергические заболевания**

Аллергические заболевания- это группа болезней

Статистические данные свидетельствуют, что с каждым годом аллергические заболевания регистрируются у 10-20% людей на земном шаре. Особенно актуальна данная проблема в промышленных центрах или определенных производствах, где уровень аллергических заболеваний может достигать 30-50%. Аллергизация населения планеты растет, что создает одну из главных проблем современной медицины. Но более актуальна аллергизация для детского возраста, именно среди детей отмечаются наиболее высокие темпы развития аллергических заболеваний.

Основными факторами риска развития аллергий являются наследственная предрасположенность, урбанизация, неблагоприятная экология, чрезмерный контакт с аллергенами, инфекционные процессы, неправильное питание, различные хронические патологии.

**1.1 Понятие крапивницы**

Крапивница (от лат. Urtica — крапива) — группа заболеваний, характеризующаяся развитием кожных волдырей и/или ангионевротических отеков, которые имеют сложные этиологические и иммунопатогенетические механизмы развития.

Крапивница очень распространённое заболевание, которым страдает порядка 15-20% населения планеты. Острая крапивница составляет 70-75% процентов всех случаев. Крапивница может возникать в любом возрасте, но чаще поражает женщин в возрасте 20-40 лет это связано с нейроэндокринными особенностями организма женщин. Другими словами, организм является более восприимчивым к различным внешним раздражителям, что ведет за собой ответную реакцию организма на многие аллергены.

Крапивница может проявляться на любых участках кожи. Основным проявлением крапивницы является волдырь. Помимо волдырей пациенты отмечают невыносимый зуд кожи. Отдельные высыпания могут исчезнуть в течение дня, оставив после себя «чистую кожу», другие напротив оставляют после себя пигментацию и шелушение.

Крапивница может сопровождаться отеком Квинке (ангиоотек, старое название - ангионевротический отек). Ангиоотек - отек, вовлекающий в патологический процесс глубокие слои кожи. По статистике в 50% случаев крапивница протекает изолированно, у 40% больных крапивницей развивается отек Квинке и у 10% пациентов возникает ангиоотек без крапивницы.  
Некоторые пациенты искренне заблуждаются, считая, что отек Квинке - это только отек лица или горла. Ангиоотек действительно часто возникает в области лица, но это не значит, что он не может появиться на кистях, стопах и других участках тела**.**

<https://www.gosmed.ru/lechebnaya-deyatelnost/spravochnik-zabolevaniy/dermatovenerologiya-bolezny/krapivnitsa/>

**1.2 Клинические формы крапивницы**

Существующие классификации предлагают рассматривать крапивницу по вариантам течения (острую и хроническую), по механизмам развития (иммунная и неиммунная), по причине возникновения и по степени тяжести.

Острая крапивница (ОК) – волдыри, возобновляющиеся в течение менее 6 недель. Отдельные очаги обычно разрешаются до 24 часов. Острая крапивница может возникать в любом возрасте, но чаще наблюдается у детей.

Хроническая крапивница (ХК) определяется как развитие кожных волдырей, которые возобновляются на регулярной основе (обычно ежедневно) более 6 недель, с отдельными обострениями продолжительностью от 4 до 36 часов. Симптомы могут быть очень разнообразными и очень серьезными, и могут привезти к ухудшению качеству жизни. Хроническая крапивница делится на спонтанную и индуцируемую. Причиной спонтанной или идиотипической крапивницы являются неизвестные внешние факторы, в то время как для индуцируемой крапивницы эти факторы известны, она развивается под действием внешних физических стимулов (тепло, вибрация, холод, вода и т.д.).

*Таблица 1*

Европейская классификация хронической крапивницы:

|  |  |
| --- | --- |
| Хроническая спонтанная (идиопатическая ) крапивница | Индуцируемая крапивница |
| Появление волдырей в течение от 6 и более недель вследствие известных и неизвестных причин | * Симптоматический дерматографизм * Индуцируемая холодом * Крапивница от давления * Контактная крапивница * Солнечная крапивница * Индуцируемая теплом * Вибрационная крапивница * Холинергическая крапивница * Аквагенная крапивница |

Симптоматический дерматографизм – наиболее распространенная форма физической крапивницы (ФК), не связанная с системным заболеванием, пищевой аллергией, атопией или аутоиммунным заболеванием. В месте механического воздействия изменение цвета кожи обусловлено реакцией (спазмом или расширением) сосудов кожи.

Крапивница индуцируемая холодом возникает в ответ на снижение температуры окружающей среды или непосредственного контакта с холодными предметами. Например, при купании, когда охлаждение воздействует на все тело, возможно развитие гипотензии, потеря сознания.

Крапивница от давления, провоцирующим фактором является вертикальное давление, волдыри появляются через 3-8 часов с момента воздействия.

Контактная крапивница развивается при непосредственном контакте внешнего агента с кожей или слизистой. Контактная крапивница может быть аллергической (с участием IgE) и неаллрегической (IgE-независимой). Аллергическая контактная крапивница возникает у людей, чувствительных к аллергенам окружающей среды (трава, пальца, продукты, животные и т.д.), или к профессиональным аллергенам, например, латесксные перчатки у медицинских работников. Неаллергическая контактная крапивница возникает вследствие прямого воздействия агента на кровеносные сосуды.

Солнечная крапивница возникает при воздействии солнца или источника искусственного света достаточно несколько минут для появления зуда, эритемы, волдырей. Системными признаками заболевания являются головная боль, тошнота, головокружение.

Крапивница индуцируемая теплом известная как тепловая контактная, провоцирующим фактором которой является локализованное тепло.

Вибрационная крапивница возникает при воздействии вибрации, например, отбойный молоток.

Холинергическая крапивница на ее долю приходится 5-7% среди всех физических крапивниц. Характеризуется появление мелкоточечных уртикарных высыпаний, окруженных зоной гиперемии. Она возникает в ответ на физическую активность, горячие ванны, после эмоционального возбуждения, сопровождается интенсивным зудом и четко связана с высвобождением ацетилхолина и гистамина.

Аквагенная крапивница возникает в результате контакта с водой любой температуры. Представляет собой мелкоточечные волдыри, высыпания могут провоцироваться принятием душа или ванны.

Крапивница может быть самостоятельным заболеванием, проявляющейся в виде аллергической реакции на какой-либо раздражитель, либо является одним из проявлений какого-либо заболевания. [4,5,6,7]

**1.4 Механизм формирования крапивницы**

В зависимости от механизма развития различают аллергическую и неаллергическую крапивницу. Аллергическая крапивница обусловлена I, реже II или III типами реакций гиперчувствительности (Gell P., Coombs R., 1975) и развиваются в сенсибилизированном организме при повторном поступлении аллергена.

Ведущим механизмом развития крапивницы является реагиновый механизм повреждения (I тип реакции гиперчувствительности по Gell P., Coombs R., 1975). Дегрануляция тучных клеток, базофилов и нейтрофилов приводит к высвобождению медиаторов воспаления. Ключевым медиатором воспаления является гистамин, также высвобождается серотонин, фактор агрегации тромбоцитов (PAF), цитокины TNF-α, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF). Также в очаге воспаления синтезируются метаболиты арахидоновой кислоты – лейкотриены С4, Е4, D4. Активация данных медиаторов ведет к вазодилатации и повышению проницаемости сосудов в результате чего образуется волдырь. Волдырь – это первичный элемент кожной сыпи, представляющий собой местный отек сосочкового слоя дермы. Проницаемость сосудистой стенки обуславливается воздействие на нее рецепторами гистамина Н1 и Н2. При активации Н1-рецепторов появляется зуд, эритема, сокращение гладких мышц в дыхательных путях и желудочно-кишечном тракте. Активация Н2-рецепторов приводит к появлению шелушения кожи и эритеме.

В качестве аллергена чаще выступают лекарственные препараты (антибиотики, рентгено-контрастные вещества и др.), сыворотки, гамма-глобулины, бактериальные полисахариды, пищевые продукты, инсектные аллергены.

Причину острой крапивницы удается установить в большинстве случаев в отличие от хронической крапивницы. В большинстве случаев причинными и триггерными факторами являются острой крапивницы являются: пищевые аллергены и лекарственные препараты, латекс, укусы насекомых, инфекционные агенты.

Дегрануляция тучных клеток может произойти вследствие разных механизмов активации, включая связывание иммуноглобулинов Е (IgE) с высокоаффинными рецепторами (FcεRI) на поверхности тучных клеток. У45% пациентов с хронической крапивницей определяются IgG-аутоантитела против как IgE (5-10%), так и FcεRI (35-40%).

Эти IgG аутоантитела могут связать FcεRI на тучных клетках и базофилах, приводя к их активации. Дегрануляция тучных клеток может быть вызвана компонентами комплемента, аутоаллергенами, нейропептидами и неизвестными механизмами.

II тип – протекает в виде антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности с активацией комплемента и последующим повреждением тканей. Лежит в основе крапивницы, возникающей при гемотрансфузиях.

III тип – протекает с образованием иммунных комплексов антиген-антитело с последующим отложением их в сосудах и тканях большинства органов с последующим развитием в них системных воспалительных реакций с участием комплемента [2,3,8].

Неиммунная острая крапивница встречается значительно чаще, чем иммунная особенно у взрослого населения. Неаллергическую крапивницу обуславливает повышение концентрации гистамина за счет:

неспецифической либерации гистамина из тучных клеток, например при употреблении продуктов гистаминолибераторов (шоколад, клубника, орехи, цитрусовые, морепродукты и т.д.);

лекарственные препараты, вызывающие высвобождение гистамина неиммунным путем (белковые препараты, миорелаксанты и общие анестетики (тиопентал и тубокурарин) витамины В1 и В6);

увеличение образования гистамина за счет дисбактериоза кишечника. [2,3]

**Диагностика крапивницы**

В отличие от причин крапивницы, диагностика крапивницы не требует лабораторного подтверждения.

**Протокол диагностики крапивницы включает:**

* Сбор анамнеза жизни и болезни пациента;
* Клинико-лабораторные методы исследования;
* Рентгенологические, инструментальные, функциональные методы обследования;
* Аллергологические методы;
* Иммунологические методы.

Расширенное диагностическое обследование, рекомендовано для пациентов с длительно сохраняющейся, тяжелой и/или персистирующей крапивницей для выяснения причин. Причинами крапивницы могут быть различные заболевания и состояния, ассоциированные с хронической крапивницей. Это могут быть вирусные инфекции (гепатит А или В), бактериальные инфекции (заболевания желудочно-кишечного тракта, вызванные Helicobacter pilori), паразитарные инвазии (лямблиоз, описторхоз), неинфекционные хронические воспалительные процессы желудочно-кишечного тракта (рефлюкс, гастрит, холецистит), аутоиммунные заболевания.

Анамнез

1. Описание элементов пациентом (вид, локализация, размер, длительность сохранения элементов, наличие зуда или боли).
2. Начало заболевания, длительность данного эпизода крапивницы.
3. Цикличность проявления элементов (время суток).
4. Эффективность Н1-антигистаминных лекарственных средств (ЛС)
5. Связь обострения с приёмом аспирина и/или НПВП, или ингибиторов АПФ или других лекарственных средств.
6. Семейный анамнез (наличие атопических заболеваний).
7. Наличие физических стимулов обострения крапивницы.
8. Выявление предшествующих или настоящих хронических или острых заболеваний, перенесенных хирургических вмешательств, переливания крови и ёё компонентов, выезда в регионы с высоким риском заражения инфекционными или паразитарными заболеваниями, посещение ресторана, стресса.
9. Связь обострений с приемом пищи.
10. Профессиональная деятельность, хобби.

Физикальное обследование

1. Диагностика крапивницы визуальная. Лабораторное подтверждение требуется только для выявления причины заболевания.

2. Волдырь при крапивнице имеет три характерных признака:

* центральный отек разных размеров, почти всегда окруженный рефлекторной эритемой
* зуд, иногда ощущение жжения
* обратимость, волдырь исчезает бесследно в течение 1-24 часов

3. Ангиоотек характеризуется следующими признаками:

* быстроразвивающийся отек глубоких слоев дермы, подкожной клетчатки и подслизистого слоя
* чувство распирания и болезненности чаще, чем зуд
* эритема может отсутствовать
* разрешение в период до 72 часов

4. Резидуальная гиперпигментация, особенно на голенях, указывает на уртикарный васкулит, буллёзные элементы заставляют думать о буллёзном пемфигоиде и герпетиформном дерматите. Красновато-коричневые пятна, превращающиеся в волдыри после расчёсывания, указывают на пигментную крапивницу. Пальпируемая пурпура на нижних конечностях часто сопровождает васкулит.

5. Выявление клинических признаков атопии (бронхоспазм, ринит, конъюнктивит).

6. Измерение АД, ЧСС.

7. Измерение температуры тела.

8. Определение размеров периферических лимфатических узлов, печени, селезёнки.

9. Аускультация лёгких, сердца.

10. Пальпаторное исследование брюшной полости.

Клинико-лабораторные исследования

Скрининговое обследование можно не проводить для пациентов с острой крапивницей, за исключением того случая если в анамнезе есть провоцирующий фактор. Так как в большинстве случаев острая крапивница проходит в течение 2 недель и использованием для лечения антигистаминных препаратов.

Скрининговое обследование показано для пациентов с хронической крапивницей, для выявления причины заболевания. Рекомендуемый спектр диагностики включает: клинический анализ крови, исследование С-реактивного белка, скрининг на паразитарные инвазии, инфекционные заболевания, гормоны щитовидной железы и антител к тиреоидной пероксидазе, атопии, тесты для исключения физической крапивницы, с лекарствами, пищевыми аллергенам, исследование иммунного статуса.

Оригинальная статья опубликована на сайте РМЖ (Русский медицинский журнал): <https://www.rmj.ru/articles/dermatologiya/Hronicheskaya_recidiviruyuschaya_krapivnica_problemy_diagnostiki_i_terapii_Roly_antigistaminnyh_preparatov_v_lechenii_hronicheskoy_recidiviruyuschey_krapivnicy/#ixzz6IN4osImS>

**1. Оценка активности крапивницы**

Для того чтобы оценить активность крапивницы в клинической и исследовательской деятельности рекомендуют использовать простую бальную систему  UAS7 (Urticaria Activity Score 7) или Индекс Активности крапивницы за 7 дней. Данная система предполагает суммарную оценку основных симптомов заболевания (количество высыпаний и интенсивность зуда), которая контролируется пациентов 24 часа в течение 7 последовательных дней. Благодаря этой системе пациент и доктор смогут объективно оценить состояние пациента и его индивидуальный ответ на проводимую терапию. Каждый симптом оценивается от 0 до3 баллов. Сумма баллов за сутки составляет от 0 до 6, максимальное количество баллов за неделю составляет 42 балла.

*Таблица 2*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Балл | Волдыри (степень проявления) | Зуд (степень проявлений) |
| 0 | Нет | Нет |
| 1 | Легкая (< 20 волдырей / 24 ч) | Легкая (присутствует, но не причиняет беспокойства) |
| 2 | Средняя (20−50 волдырей / 24 ч) | Средняя (беспокоит, но не влияет на дневную активность и сон) |
| 3 | Интенсивная (> 50 волдырей / 24 ч или большие сливающиеся волдыри) | Интенсивная (тяжелый зуд, достаточно беспокоящий, нарушающий дневную активность и сон) |

Сумма баллов активности крапивницы за 7 дней может отражать тяжесть болезни:

* Отсутствие волдырей и зуда (0 баллов);
* хорошо контролируемое заболевание (1−6 баллов);
* легкое течение (7−15 баллов);
* средней тяжести (16−27 баллов);
* тяжелое течение (28−42 балла).

Данный индекс также позволяет объективно оценить индивидуальный ответ на назначенную врачом терапию.

**1.2 Понятие ожирения**

Ожирение –хроническое, воспалительное, гетерогенное, прогрессирующее заболевание, характеризующееся избыточным накоплением жировой ткани [9].

По данным ВОЗ на 2016 год более 1,9 миллиарда взрослого населения старше 18 лет имели избыточный вес, из них свыше 650 миллионов страдают ожирением.

Основной причиной ожирения считают нарушение энергетического баланса между потребляемыми и расходуемыми калориями. Во всем мире отмечаются тенденции:

* рост потребление продуктов питания с высоким содержанием жиров и сахаров
* снижение физической активности населения, связанная с сидячим образом жизни.

Ожирение негативно влияет на качество жизни человека, а также на все сферы его деятельности. Часто ожирение приводит к тяжелым сопутствующим заболеваниям, что в свою очередь ведет к снижению трудоспособности и инвалидности. Люди с избыточным весом и ожирением испытывают трудности вследствие наличия серьезных отклонений в состоянии здоровья, физические и психологические проблемы.

Избыточный вес способствует развитию инсулинорезистености (ИР), что способствует развитию сахарного диабета 2 типа (СД2). Возрастает риск развития сердечно-сосудистых осложнений, ишемической болезни сердца (ИБС), гипертонической болезни (ГБ), инсульта. Колоссальная нагрузку на себе испытывает опорно-двигательный аппарат, который приводит к остеоартриту – инвадилизирующее дегенеративное заболевание суставов. Риск развития некоторых онкологических заболеваний (рак предстательной железы, рак печени, почек, желчного пузыря, толстой кишки). Для женщин ожирение опасно ановуляцией, нарушением менструального цикла, синдромом поликистоза яичников, бесплодием, а также высоким риском развития онкологических заболеваний, таких как рак эндометрия шейки матки, рак яичников, рак молочных желез.

Индекс массы тела (ИМТ) - отношение массы тела к росту, часто используется для диагностики ожирения и избыточного веса у взрослых. Индекс рассчитывается как отношение массы тела в килограммах к квадрату роста в метрах (кг/).

Согласно всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) диагноз избыточный вес или ожирение у взрослых ставится в следующих случаях:

* ИМТ больше или равен 25 – избыточный вес;
* ИМТ больше или равен 30 – ожирение.

ИМТ является наиболее удобной мерой оценки уровня ожирения и избыточного веса в популяции, поскольку он одинаков для обоих полов и для всех возрастных категорий у взрослых.

Жировая ткань – отдельный орган эндокринной и иммунной системы. Она является источником ряда высокоактивных веществ гормонов, участвует в секреции большинства цитокинов, регулирует иммунный ответ.

Наибольшее значение придают именно абдоминальному, а точнее висцеральному ожирению. Установлено, что висцеральная жировая ткань обладает эндокринной и паракринной активностью. Адипоциты висцеральной жировой клетчатки обладают повышенной чувствительностью к липолитическому действию катехоламинов и низкой к антилиполитическому действию инсулина. Они секретируют свободные жирные кислоты, которые препятствуют связыванию инсулина с гепатоцитом, нарушают передачу сигнала от рецептора в клетку, что ведет к гиперчувствительноси и потенцирует инсулинорезистентность.

Наряду со свободными жирными кислотами адипоциты продуцируют адипоцитокины – фактор некроза опухоли (TNF-α), тканевый фактор роста – β1 (TGF-β1), интерлейкин – 6 (ИЛ-6), лептин, адипонектин, резистин, индуцибельная NO-синтаза, которые также влияют на чувствительность тканей к инсулину. [1,9,12].

**1.3 Роль и функции цитокинов**

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма, являются медиаторами межклеточного взаимодействия в любых физиологических и патологических иммунных реакциях. Для цитокинов характерен сложный сетевой характер функционирования, при котором продукция одного из них влияет на образование или проявление активности ряда других. Предполагается, что в цитокиновом профиле у пациентов с ХРК на фоне ожирения преобладают провоспалительные цитокины, усиливающие аллергическое воспаление кожи, в сравнении с пациентами с нормальной массой тела. [1,6,12,].

Интерлейкин 10 (IL-10) противовоспалительный цитокинин с молекулярной массой 17 - 21 кДа. Он обладает многими противововоспалительными свойствами, включая способность подавлять лихорадку. Продуцируется Т-клетками (Th2) и может рассматриваться как антагонист ряда других цитокинов. Так, IL-10 подавляет продукцию Th1-клетками. Кроме того он, тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и митогены, а также подавляет секрецию активированными моноцитами ФНО и ИЛ-6. В то же время IL-10 стимулирует секрецию Ig E. В своем ингибирующем действии на клеточный иммунитет IL-10 синергичен с IL-4. Стимуляция созревания Трег-лимфоцитов путем воздействия на дендритные клетки. Ингибирование созревания дендритных клеток, активирующих Th2, экспрессии ими молекул ΙΙ класса главного комплекса гистосовместимости и костимуляторных молекул и, как следствие, подавление активации Th2.

Интерлейкин 12 (IL-12) – это плейотропный цитокин, прежнее название - фактор созревания цитотоксических лимфоцитов (CLMF) или фактор, стимулирующий натуральные киллеры (NKSF), который в первую очередь синтезируется стимулированными макрофагами. Был идентифицирован как фактор, продуцируемый линией В-клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр. Между тем, показано, что IL-12 является провоспалительным цитокином, синтезируемым фагоцитами, В-клетками и другими антиген-презентирующими клетками, которые модулируют адаптивный иммунный ответ преимущественно стимулируя продукцию Т-хелперов I типа. IL-12 влияет на разнообразные биологические эффекты, проявляющиеся в человеческих T-клетках и натуральных киллерах. Кроме стимуляции развития Th1-клеток и способности активизировать цитолитическую активность он опосредует некоторые из физиологических эффектов, действуя в качестве сильного индуктора синтеза интерферона гамма (IFNγ) и других цитокинов в периферической крови T- и NK-клетками. IFNγ, в свою очередь, усиливает способность фагоцитов продуцировать IL-12 и другие провоспалительные цитокины. Таким образом, IL-12 стимулирует действие IFNγ по принципу положительной обратной связи, которая представляется важным усиливающим механизмом в воспалительном ответе на инфекции. Его роль в направлении развития Th1-типа иммунного ответа наивных T-клеток состоит в регуляции иммунного ответа и предполагает его потенциальное использование в терапии рака. IL-12 - обладает гетеродимерной структурой, состоящей из двух субъединиц м.м. тяжелой 40 кДа (р40) и легкой 35 кДа (р35), связанных между собой дисульфидными мостиками. Биологически активной формой IL-12 является только гетеродимер 70kDa (p70). Субъединица p40 может находиться в форме гомодимера, который связывается с рецептором IL-12 и таким образом действует как антогонист. Субъединица р40 секретируется в большом избытке по сравнению с p70. Доказана важнейшая роль IL-12 в патогенезе различных заболеваний. Повышенная концентрация была найдена у пациентов с нейрологическими расстройствами. Значительное повышение было зарегистрировано у лиц, страдающих аутизмом и рассеянным склерозом, а также у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и хроническими воспалительными реакциями, например, в синовиальной жидкости пациентов с остеоартритом, ревматоидным артритом и серонегативной спондилоартропатией; у пациентов с синдромом Шегрена и атеросклерозом. Экспрессия IL-12 меняется при разнообразных бактериальных и вирусных инфекциях, таких как обструктивная желтуха, септический шок, инфицирование Mycobacterium tuberculosis, ВИЧ. Интерлейкин-12 также играет критическую роль в отторжении трансплантата и воспалительном поражении кожи в некоторых случаях.

Интерлейкин 19 (IL-19) — гомологичен IL-10, IL-19 имеет характерную структуру, представленную шестью спиралями, которая сохраняется у всех генов семейства IL-10. IL-19 не связывается с рецепторным комплексом IL-10, а наряду с другими новыми членами семейства IL-20, 24 передает сигнал через гетеродимер IL-20Р1/IL-20Р2. Одна из возможных функций IL-19 состоит в поддержании баланса между Th 1 и Th2. С другой стороны IL-19 может играть роль в иммунном воспалению.

Интерлейкин 20 (IL-20) — является гомологом IL-10 и относится к его семейству. Данных по его функциональной активности мало, отмечается, что IL-20 усиливает хемотаксис нейтрофилов в зону воспаления и индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и МСР, показана его роль в патогенезе ревматоидного артрита и псориаза.

Интерлейкин 27 (IL-27) является членом семейства IL-12, подгруппы семейства цитокинов IL-6. Это гетеродимер имеет следующие субъединицы: EBI3 (ген 3, индуцированный вирусом Эпштейна-Барр), гомологичную субъединице p40, общей для IL-12 и IL-23, и субъединицу p28 (IL-30), которая гомологична p35. IL-27 продуцируется активированными дендритными клетками и макрофагами, стимулированными TLR лигандом и воспалительными цитокинами. Рецептор IL-27 имеет субъединицу gp130, общую с другими членами семейства IL-6. Другая субъединица WSX-1 (IL-27Rα, TCCR) является уникальной для IL-27 и, как считается, она лишь часть рецептора, который взаимодействует с цитокином. IL-27R наиболее сильно экспрессируется на активированных Т- и NK-клетках, хотя он также был обнаружен на B- и наивных Т-клетках. Активация IL-27R приводит к фосфорилированию Jak/STAT белков, а STAT1 и STAT3 принципиальны для функционирования IL-27. IL-27 имеет оба: и провоспалительный и противовоспалительный эффекты. Это влияет на коммитмент (созревание) CD4+ Т-клеток в направлении Th1, что индуцирует экспрессию фактора транскрипции T-bet и IL-12Rβ2. Его противовоспалительные функции включают в себя супрессию пролиферации и дифференцировки клеток Th2 и Th17.

Интерлейкин-28 (IL-28) представляет собой цитокин, который имеет 2 изоформы: IL-28A и IL-28В, и играет важную роль в иммунной защите против вирусов, включая индукцию "противовирусного статуса" путем активации Mx протеинов, 2',5'-олигоаденилатсинтетазы а также ISGF3G (фактор 3 интерфероном стимулируемого гена). IL-28A и IL-28B относятся к семейству цитокинов интерферонов типа III и очень похожи (по аминокислотной последовательности) на IL-29. Интерлейкин-28A представляет собой новый цитокин, обнаруженный в последние годы. Было показано, что он обладает противовирусной активностью. IL-28А, IL-28В и IL-29 представляют собой семейство цитокинов класса II, которые стимулируют противовирусный ответ через гетеродимерный рецептор, отличающийся от рецептора интерферона типа I.

Интерлейкин-29 (IL-29) представляет собой белок семейства спиральных цитокинов и интерферон типа III, выполняющий много функций семейства интерферонов типа I. Ген IL-29 находится на хромосоме 19 человека. Он также известен как IFN-λ1 и очень похож по аминокислотной последовательности на IL-28, другой интерферон типа III. IL-29 не связывает рецептор ИФН-α/β, но вместо этого вовлечен в сигналинг через рецептор, состоящий из субъединиц IL- 28R1 и IL-10R2. В первых сообщениях, описывающих характеристики рецептора, показано, что он имеет повсеместное распространение в тканях и экспрессируется на большинстве негематопоэтических клеток. Продукция нативного IL-29 осуществляется моноцитами и дендритными клетками в ответ на вирусную инфекцию и стимуляцию лигандами толл-подобных рецепторов. IL-29 играет важную роль в защите организма хозяина против микробов, и его ген усиливает свою активность в клетках, инфицированных вирусами. IL-29 обладает выраженной антивирусной активностью и иммунорегуляторными свойствами и, кажется, ингибирует Th2-ответ через ингибирование синтеза IL-13 по сравнению с IL-4 и IL-5. Противовирусная активность IL-29 включает регуляцию экспрессии молекул MHC класса I на клеточной мембране и экспрессию PKR (протеинкиназного рецептора). Комплекс лиганд/рецептор, кажется, передает сигнал через Jak-STAT путь.

Интерлейкин 35 (IL-35) представляет собой цитокин семейства IL-12, который вырабатывается регуляторными, но не эффекторными Т-клетками и играет роль в подавлении иммунитета. Это димерный белок, состоящий из цепей IL-12α и IL-27β, которые кодируются двумя отдельными генами, называемыми IL-12A и EBI3, соответственно. Секретируемый регуляторными Т-клетками (Tregs), IL-35 подавляет воспалительные реакции иммунных клеток. Исследования на мышах показывают, что отсутствие цепи IL-35 в регуляторных Tregs снижает способность клеток подавлять воспаление; это наблюдалось во время экспериментов по культивированию клеток и с использованием экспериментальной модели воспалительного заболевания кишечника. Для получения своих супрессивных эффектов IL-35 обладает селективной активностью в отношении различных подмножеств Т-клеток; он индуцирует пролиферацию клеточных популяций Treg, но снижает активность клеточных популяций Th17.

Факторы некроза опухоли (TNFs) являются плейотропными цитокинами, которые считаются первичными модификаторами воспалительных и иммунных реакций животных, продуцируемых в ответ на травму или инфекции. Описанные две формы TNF, называемые TNF-α (или кахектин) и TNF-β (или лимфотоксин), разделяют 30% идентичности аминокислотных последовательностей и конкурируют за связывание одних и тех же рецепторов. TNFs выполняют необходимую и полезную функцию медиаторов резистентности к инфекциям и образованию опухолей. Тем не менее, гиперпродукция или несоответствующая экспрессия этих факторов может привести к различным патологическим состояниям, в том числе истощению, системной токсичности и септическому шоку. Действие TNFs осуществляется связыванием факторов с рецепторами клеточной поверхности. Два различных рецептора TNF были идентифицированы и клонированы. Практически все изученные типы клеток имеют один или оба типа этих рецепторов. Первый тип рецептора, называемый TNF RII (типа А, 75 кДа или utr антиген), имеет кажущуюся м.м. 75 кДа. Ген этого рецептора кодирует предполагаемый трансмембранный белок длиной 439 аминокислотных остатка (аа). Другой тип рецептора, называемый TNF RI (тип B, 55 кДа или htr антиген) имеет кажущуюся м.м. 55 кДа. Ген этого рецептора кодирует трансмембранный белок из 426 аа. Оба типа рецепторов имеют высокую аффинность связывания и с TNF-α, и с TNF-β. Эти два типа рецепторов различаются, но их внеклеточные домены имеют сходство в порядке расположения остатков цистеина в четырех доменах. Внутриклеточные домены этих двух типов рецепторов, по-видимому, не родственны, что свидетельствует о возможности того, что они используют различные пути сигнальной трансдукции. Кроме того, дополнительно еще не идентифицированный внутриклеточный фактор может быть вовлечен в передачу сигнала. Несколько групп растворимых TNF связывающих белков было идентифицировано в сыворотке и моче человека, они могут нейтрализовать биологическую активность TNF-α и TNF-β. Два типа были идентифицированы как sTNF RI (или TNF BPI) и sTNF RII (или TNF BPII). Эти растворимые формы, как сейчас установлено, представляют собой усеченные формы обсуждаемых выше двух типов рецепторов TNF. Растворимые формы рецепторов, видимо, возникают в результате шеддинга внеклеточных доменов рецепторов, в концентрации приблизительно 1-2 нг/мл они обнаружены в сыворотке и моче здоровых лиц. Уровни растворимых рецепторов колеблются от индивидуума к индивидууму, но являются стабильными во времени у конкретного человека. Повышенные уровни растворимых рецепторов TNF были обнаружены в амниотической жидкости и моче беременных женщин, в сыворотке или плазме при патологических состояниях, таких как эндотоксинемия, менингококцемия и ВИЧ-инфекция, и в плазме и асцитной жидкости пациентов с инфекциями и злокачественными опухолями. Механизмы индукции шеддинга рецепторов TNF не до конца установлены. Есть сообщения о корреляции между повышением уровня TNF и уровнем растворимых рецепторов, что предполагает, в общем, что стимулы, которые вызывают рост уровня TNF, также вызывают шеддинг рецепторов TNF. Существует также доказательство того, что шеддинг двух типов растворимых рецепторов регулируется независимо. Физиологическая роль растворимых рецепторов TNF не выяснена. Известно, что оба типа растворимых рецепторов могут связывать TNF in vitro и ингибируют его биологическую активность, конкурируя с рецепторами связывания TNF на поверхности клеток. Поэтому было высказано предположение, что шеддинг растворимых рецепторов в ответ на релиз TNF может служить механизмом связывания и ингибирования TNF, чтобы он не мог сразу связаться с поверхностными рецепторами, тем самым защищая другие клетки от эффектов TNF и ограничивая воспалительный ответ определенным местом. Возможно также, что шеддинг рецепторов представляет собой механизм десенсибилизации клеток, которые слущивают рецепторы, избегая тем самым действия TNF. С другой стороны, сообщалось, что при низкой концентрации TNF связывание с растворимыми рецепторами может стабилизировать TNF и усилить некоторые его эффекты. Таким образом, возможно, что при некоторых условиях пул TNF, связанный с растворимыми рецепторами, может представлять собой резервуар для стабилизации и контролируемого высвобождения TNF. [1,4,6,12,15].

Роль витамина D в патогенезе аллергических заболеваний

Установлено, что витамин D в патогенезе аллергических заболеваний обладает иммунорегуляторным действием, участвует в противомикробной защите организма и обладает барьерной функцией кожи и слизистых. Недостаток или дефицит витамина D может быть патогенетической основой аллергической патологии. В связи с этим уровень витамина D определяет тяжесть и эффективность лечения в патогенезе аллергических заболеваний.

К формам витамина D относятся витамин D2 (эргокальциферол), преимущественно содержащийся в растительной пище (авокадо, грибы) и витамин D3, который продуцируется из 7-дегидрохолестерина в коже под воздействием ультрафиолетового (УФ)- облучения или содержаться в пище животного происхождения и других продуктах (сливочное масло, рыба, яичный желток). Эти две форма витамина D не являются биологически активными до тех пор, пока не свяжутся с белком VDBP (vitamin D bindidg protein, витамин D-связывающий белок) в крови. После метаболизма в печени, превращаются в формы 25-ОН витамин D2 (кальцидол) и 25-ОН витамина D3 (кальцитриол), которые являются формами для запаса витамина с невысокой активностью. После метаболизма в печени витамин D становится 1,25- дигидрокси витамин D – биологически активным метаболитом, который функционирует как гормон (D-гормон). Данный гормон регулирует усвоение кальция из кишечника, минерализацию костей, а также влияет на нейромышечные функции.

Рецепторы витамина D (VDR), как мембранные, так и нуклеарные, обнаружены почти во всех типах клеток иммунной системы — нейтрофилах, моноцитах, макрофагах, Т (CD4 и CD8) и В лимфоцитах, а также дендритных и эпителиальных клетках. Было установлено, что моноциты/макрофаги обладают способностью автономного синтеза для своих потребностей 1,25(ОН)2D из 25(ОН)D благодаря наличию у них фермента 1α-гидроксилазы. Поэтому недостаточность витамина D может быть причиной изменения иммунного ответа и инициировать патологию иммунной системы.

Помимо влияния витамина D на Th1 и Th2 иммунный ответ, способствует индукции регуляторных T клеток [9]. Значительная концентрация рецепторов витамина D отмечается в популяциях Т лимфоцитов и макрофагов, но самая высокая — в незрелых иммунных клетках тимуса и зрелых CD8 Т лимфоцитах. Витамин D стимулирует выработку трансформирующего фактора роста (Transforming Growth Factor, TGF) β1 и интерлейкина (IL) 4, что в свою очередь подавляет воспалительную активность T клеток [10].

Показано, что витамин D оказывает выраженное влияние на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность тучных клеток, тем самым участвуя в аллергических реакциях [6, 11]. Соответственно, 1,25(OH)2D3 (кальцитриол), с современных позиций, рассматривается как иммуномодулятор, воздействующий на различные клетки иммунной системы [12].

Основные эффекты витамина D на иммунную систему [13] представлены на рис. 1

ВСТАВЬ РИСУНОк Статья 670

витамин D, который связывается со специфическими ядерными рецепторами в тучной клетке, что приводит к активации соответствующих генов в мастоците [3]. К геномным эффектам витамина D относят: торможение активации и дегрануляции тучных клеток, угнетение образования мастоцитов в костном мозге [4, 14]. Витамин D обладает ингибирующим действием на IgE-опосредованную активацию мастоцитов и влиянием на пассивную кожную анафилаксию [13, 15]. Hata и соавт. впервые в 2010 году изучили уровень кальцидиола – основного метаболита витамина D, у пациентов с ХСК [12]. Оказалось, что средняя концентрация кальцидиола в сыворотке крови больных ХСК была достоверно ниже, чем в группе здорового контроля [12]. Дальнейшие немногочисленные работы демонстрируют не только широкое распространение гиповитаминоза D у больных ХСК, но и дают основание рассматривать витамин D в качестве одного из немногочисленных биохимических маркеров заболевания [8]. В 2017 году нами был впервые описан метаболизм витамина D у больных ХСК и выдвинута гипотеза активации потребления клетками иммунной системы гормонально активного метаболита – кальцитриола [1].

Различными авторами показано, что на заболеваемость кожными и респираторными формами аллергии влияют отдельные полиморфизмы генов рецептора витамина D (FokI, BsmI, TaqI, ApaI), витамин-D-связывающего белка, CYP2R1. До сих пор нет полного представления и единого мнения о возможных механизмах участия витамина D в патогенезе аллергии. По всей видимости, речь идет о различных путях влияния витамина на аллергический процесс. (статья)

# **Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Клиническим материалом служила венозная кровь, взятая из локтевой вены пациентов исследуемой и контрольной групп. В исследование было включено 31 человек. Пациенты исследуемой контрольной группы в возрасте 20-55 лет: женщины (9) и мужчины (1), n=10, с индексом массы тела (ИМТ) 18,5<ИМТ<25. Пациенты 2 группы аналогичного возраста, в анамнезе ХРК и ожирение : женщины (4) и мужчины (3), n=7, ИМТ>27. Пациенты 3 группы 20-55 лет с ХРК: женщины (11) и мужчины (3) 18,5<ИМТ<25. Критерием отбора в контрольную группу служило отсутствие в анамнезе ХРК и ожирения.

Пациенты подписывали информированные согласия для исследований, заполняли специальные анкеты, проходили взвешивание, измерение роста, получали клиническую консультацию врача иммунолога-аллерголога.

## **2.1 Анализ биохимических показателей**

## **2.1.1 Определение концентрации общего билирубина в сыворотке крови**

Концентрацию билирубина определяем при помощи набора Вектор-Бест (Новосибирск) Билирубин–Ново.

**Принцип метода:**

Прямой (связанный, конъюгированный с глюкуроновой кислотой) билирубин непосредственно реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, а общий билирубин – в присутствии кофеинового реагента с образованием окрашенного азосоединения. Интенсивность окраски

реакционной среды пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 535нм.

Нормальные величины: 8,5-20,5 мкмоль/л

**Проведение анализа:**

Измерение происходит при длине волны 535 нм, температуре 37 градусов, длине оптического пути 10 мм.

Установить пробу на борт анализатора Accеnt 200 (Польша), удостовериться, что хватает реагентов, если нет, то долить реагенты до нужного числа проб.

Затем задать программу, т.е. ввести какие показатели нужно измерить, в нашем случае билирубин, нажать запуск.

В основе расчета содержания лежит формула

**С=Е/Ек\* 85,5,** где

**Е** – Оптическая плотность опытной пробы

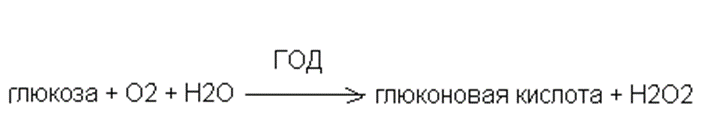
**Ек** – Оптическая плотность калибровочной пробы

**85,5**– концентрация билирубина в калибраторе мкмоль/л

## **2.1.2 Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови**

Концентрацию глюкозы определяем при помощи набора Новоглюк-Ново («Вектор-Бест», г. Новосибирск).

**Принцип метода:**

****

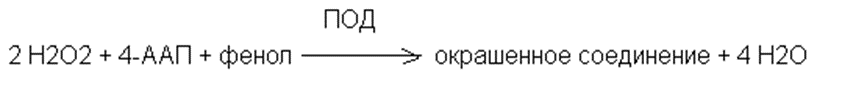
****

Рис. 1. Химические реакции метода определения концентрации глюкозы. Обозначения: ГОД–глюкооксидаза; 4-ААП –4-аминоантипирин; ПОД – пероксидаза.

**Проведение анализа:**

Измерение происходит при длине волны 510 нм, температуре 37оС, длине оптического пути 10 мм.

Нормальные величины: 3,5-6,1 ммоль/л

Установить пробу на борт анализатора Accеnt 200 (Польша), удостовериться, что хватает реагентов. Если нет, то долить реагенты для нужного числа проб.

Затем задать программу, т.е. ввести какие показатели нужно измерить, в нашем случае глюкозу, и нажать запуск.

В основе расчета содержания лежит формула

**С=Е/Ек\*** **10**, где

**Е** – Оптическая плотность опытной пробы,

**Ек** – Оптическая плотность калибровочной пробы,

**10** – концентрация глюкозы в калибраторе, ммоль/л

## **2.1.3 Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови**

Активность АЛТ определяем при помощи набора Вектор-Бест (Новосибирск) Трансаминаза-АЛТ–Ново.

**Принцип метода:**

АЛТ катализирует реакцию переаминирования между L-аланином и альфа-кетоглутаратом с образованием глутаминовой и пировиноградной кислот. Определение активности основано на измерение оптической плотности при длине волны 490 нм окрашенного в щелочной среде 2,4-

динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, концентрация которого пропорциональна активности АЛТ.

**Проведение анализа:**

Измерение происходит при длине волны 490 нм, температуре 37 градусов, длине оптического пути 10 мм.

Нормальные величины: жен: до 31 Е/л; муж: 40 Е/л;

Установить пробу на борт анализатора Accеnt 200 (Польша), удостовериться, что хватает реагентов, если нет, то долить реагенты до нужного числа проб.

Затем задать программу, т.е. ввести какие показатели нужно измерить, в нашем случае АЛТ, и нажать запуск.

В основе расчета активности лежит калибровочный график, где на оси ординат разница оптических плотностей опытных и контрольных пробы, а на оси абсцисс соответствующие им значения.

## **2.1.4 Определение активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови**

Активность АСТ определяем при помощи набора Вектор-Бест (Новосибирск) Трансаминаза-АСТ–Ново.

**Принцип метода:**

АСТ катализирует реакцию переаминирования между аспартатом и альфа-кетоглутаратом с образованием глутаминновой и щавелевоуксусной кислот. Определение активности основано на измерение оптической плотности при длине волны 490 нм окрашенного в щелочной среде 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, концентрация которого пропорциональна активности АСТ.

**Проведение анализа:**

Измерение происходит при длине волны 490 нм, температуре 37 градусов, длине оптического пути 10 мм.

Нормальные величины: жен: до 31 Е/л; муж: 38 Е/л;

Установить пробу на борт анализатора Accеnt 200 (Польша), удостовериться, что хватает реагентов, если нет, то долить реагенты до нужного числа проб.

Затем задать программу, т.е. ввести какие показатели нужно измерить в нашем случае АСТ и нажать запуск.

В основе расчета активности лежит калибровочный график, где на оси ординат разница оптических плотностей опытных и контрольных пробы, а на оси абсцисс соответствующие им значения.

## **2.1.5 Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови**

Концентрацию СРБ определяем при помощи набора Вектор-Бест (Новосибирск) СРБ.

**Принцип метода:**

Определение СРБ иммунотурбидиметрическим методом основано на взаимодействии этого белка со специфическими антителами с образованием иммунокомплексов, преципитация которых приводит к увеличению мутности раствора при 340 нм пропорционально концентрации СРБ в образце.

Нормальные величины: < 5 мг/л

**Проведение анализа:**

Измерение происходит при длине волны 340 нм, температуре 37 градусов, длине оптического пути 10 мм.

Установить пробу на борт анализатора Accеnt 200 (Польша), удостовериться, что хватает реагентов, если нет, то долить реагенты до нужного числа проб.

Затем задать программу, т.е. ввести какие показатели нужно измерить, в нашем случае СРБ, нажать запуск.

**Расчеты**:

Рассчитать разницу A2-A1 для бланка, стандарта и образца.

СРБ(мг/л)=С(станд.)**\*** , где

С(станд.) – концентрация стандарта.

## **2.2 Анализ иммунологических показателей**

Панель скрининга человеческих цитокинов Treg 12 Plex Panel позволяет обнаруживать и количественно определять 12 биомаркеров воспаления цитокинов Treg. Для проведения анализа требуется всего лишь 12,5 мкл образца.

Уникальная и релевантная смесь мишеней – единственный доступный набор для анализа на основе гранул Luminex. В наборе единый коэффициент разбавления для всех целей и одноуровневый контроль. Бусины и наборы для соединения Bio-Plex COOH позволяют разрабатывать уникальные мультиплексные анализы на основе бус для новых цепей с использованием шариков с карбоксильным покрытием, готовых ковалентно связаться с любым белком или нуклеиновой кислотой.

Содержание в сыворотки крови 12 цитокинов (IL-2, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27 (p28), IL-28/IFN-α2, IL-29/IFN-α1, IL-35 (34) оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex Protein Assay System (USA) c использованием коммерческих тест-систем 12-Plex (определяемый динамический диапазон 2-32000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

**Принцип метода:**

Принцип Bio-Plex Pro Assay (Bio-Rad) аналогичен принципу сэндвич-структуры ИФА (ELISA), отформатированного для использования с магнитными микросферами. **Антитела (АТ), специфичные к определенному аналиту, ковалентно иммобилизируются на микросферах.** При нанесении **биообразца**, АТ вступают в реакцию с содержащимися в нем молекулами аналита. Магнитное поле позволяет надежно удерживать магнитные микросферы в емкости при промывке, исключая потерю образца. После серии промывок, направленных на удаление несвязанного аналита, добавляется **«детектирующее» биотинилированное идентифицирующее АТ** для создания **сэндвич-комплекса «иммобилизированное АТ-аналит-детектирующее АТ».** Окончательно комплекс формируется после добавления **конъюгата стрептавидина и фикоэритрина, который служит флуоресцентным индикатором.** Сбор данных, полученных в результате реакций, производится системой мультиплексного анализа Bio-Plex 200 (Bio-Rad). После проведения иммуноферментной реакции, суспензия помещается в анализатор, подается в проточную ячейку, где окрашивается двумя лазерами. **Красный** (635 нм) лазер освещает флуоресцентные красители, которыми отмечена каждая микросфера, классифицирует микросферы и производит **идентификацию пробы**.

В то же время **зеленый (**532 нм) лазер **возбуждает молекулы фикоэритрина** (PE), эмиссионное излучение которого детектируется фотоэлектронным умножителем. Цифровой процессор Bio-Plex 200 обрабатывает полученные данные, однозначно определяя количество каждого детектируемого типа микросфер. Концентрация аналита, связанного с микросферой, пропорциональна средней интенсивности флуоресценции фикоэритрина на соответствующей микросфере.

С помощью стандартных калибровочных разведений концентрация исследуемых 12 цитокинов в тестируемых образцах сыворотки высчитывается автоматически на персональном компьютере с использованием программы «Bio-Plex Manager»

## **2.3 Статистическая обработка данных**

Для оценки полученных данных, их сравнения и выявления статистически значимых различий между группами были использованы электронные таблицы Excel 2003 и пакет прикладных программ SPPS 19.0.

Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (P25-P75).

Чтобы оценить, есть ли значимые различия между значениями полученных данных у мужчин и женщин, использовался U критерия Манна-Уитни p<0,05.

# **Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

**Анализ биохимических показателей**

*Таблица 1*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатель | Референтные значения | Контрольная группа | Пациенты с ожирением и ХРК | Пациенты с ХРК | Уровень значимости |
| Билирубин общий,ммоль/л Ме (Р25-Р75) | 2,7-21,0 | 11,5 (8,5-15,2) | 19,0 (13,5-19,5)\* | 14,6 (11,3-18,1) | p<0,05 |
| Глюкоза, ммоль/л Ме (Р25-Р75) | 3,5-6,1 | 4,8 (4,5-5,0) | 5,0 (4,7-6,9) | 5,0 (4,8-5,2) | p>0,05 |
| АСТ, Ед/л Ме (Р25-Р75) | Жен:<31 Муж:<40 | 16,0 (13,0-22,0) | 25,0 (21-34)\* | 16,0 (14,0-24,0) | р<0,05 |
| АЛТ, Ед/л Ме (Р25-Р75) | Жен:<31 Муж:<38 | 19,0 (15,0-29,0) | 21,0 (20,0-26,0) | 15,0 (11,0-18,0) | p>0,05 |
| СРБ, мг/л Ме (Р25-Р75) | 0-5 | 1,3 (0,3-2,0) | 2,5 (0,2-7,8) | 1,6 (0,8-2,0) | p>0,05 |

Проанализировав результаты из табл. 1, видно, что такие показатели как: глюкоза, АЛТ, СРБ находятся в пределах референтных значений. Показатели АСТ и общий билирубин в группе пациентов с ожирением и ХРК повышены. Статистически значимых отличий обнаружены (p<0,05). Это дает нам возможность думать, что на фоне приема антигистаминных препаратов уровень данных показателей может отличаться.

**Анализ цитокинового профиля**

*Таблица 2*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатель | Контрольная группа | Пациенты с ожирением и ХРК | Пациенты с ХРК | Уровень значимости |
| IL 12, пг/мл Ме (Q25;Q75) | 0,00  (0,00-1,40) | 0,00  (0,00-0,00) | 0,00  (0,00-114,00) | р>0,05 |
| IL19, пг/мл  Ме (Q25;Q75) | 8,04  (0,00-14,65) | 0,00  (0,00-8,04) | 9,52  (6,03-69,26) | р>0,05 |
| 20, пг/мл  Ме (Q25;Q75) | 1,13  (0,00 -2,12) | 1,13  (0,00-1,13) | 1,13  (0,00-11,3) | р>0,05 |
| IL 27, пг/мл  Ме (Q25;Q75) | 0,00  (0,00-0,00) | 0,00  (0,00-0,00) | 5,25  (0,00-72,26) | р>0,05 |
| IL 28, пг/мл  Ме (Q25;Q75) | 0,00  (0,00-0,78) | 0,00  (0,00-0,00) | 3,45  (0,00-57,11) | р>0,05 |
| IL 29, пг/мл  Ме (Q25;Q75) | 2,21  (0,00-10,50) | 4,42  (1,27-10,50) | 10,50  (4,42-159,45) | р>0,05 |
| IL 35, пг/мл  Ме (Q25;Q75) | 0,00  (0,00-0,00) | 0,00  (0,00-0,00) | 35,40  (0,00-371,46) | р>0,05 |

Полученные результаты исследования цитокинового профиля, позволяют выявить тенденцию к повышению уровня провоспалительных цитокинов (IL-27, 28, 29), а также повышения уровня противовоспалительных цитокинов (IL-19,20,35) у пациентов с крапивницей. А в группе пациентов с ХРК и ожирением, наблюдает повышение провоспалительного цитокина IL-29. Статистически значимых отличий не обнаружено (p>0,05).

# **ВЫВОДЫ**

1. В группе пациентов с ожирением и ХРК, а также в группе с ХРК и нормальной массой тела статистически значимые различия по биохимическим показателям были выявлены (р<0,05)
2. В группе пациентов с ожирением и ХРК, а также в группе пациентов с ХРК и нормальной массой тела выявлена тенденция к дисбалансу следующих цитокинов IL-19, IL-27, IL-28, IL-29, IL-35.

# **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аллергология и иммунология: национальное руководство / под ред. Р.М.Хаитова, Н.И. Ильиной. – М.: ГЭОТАР- Медиа, 2009 – 656с.
2. Гиперчувствительность к пищевым антигенам как предиктор развития метаболического синдрома / П.С. Новиков, Н.А. Черевко, С.Э. Кондаков и др. // Цитокины и воспаление. – 2016. Т. 15, № 3-4. – С. 280-284.
3. Диагностика пищевой гиперчувствительности, опосредованной иммунопатологическими реакциями III типа / А.З. Розенштейн, М.Ю. Розенштейн, С.Э. Кондаков, Н.А. Черевко // Российский иммунологический журнал. – 2015. Т. 9 (18), № 2. – С. 150-153.
4. Данилычева И.В. // Мед. вестик. – 2007. - №40. – С.425
5. Дякина Н.Ю., Гущин И.С. Неаллергические средовые факторы предрасположенности к аллергии // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2001. -№3. -С.3-7
6. Климов В.В. и соавт. Клиническая иммунология и аллергология. – Т.: Издво «Печатная мануфактура», 2008. – 212 с
7. Клиническая иммунология и аллергология/ Под ред. Г.Лолора-мл., Т.Фишера, Д.Адельмана. Пер. с англ. - М.: Изд-во "Практика", 2000. - 806 с.
8. Крапивница и ангиоотек: рекомендации для практических врачей / под ред. И.С. Гущина, И.Н. Ильиной. – М.: ФармусПринт Медиа, 2007. – 128с.
9. Ожирение: учебное пособие / А.Ю. Барановский, Воробихина Н.В. – Санкт Петербург, - 2007. – 20-40 с.
10. Пищевая непереносимость: учеб. пособие / А.Ю. Барановский, Л.И. Назаренко, К.Л. Райхелъсон – Санкт-Петербург, – 2006. – 6-115 с.
11. Сибгатуллина Н.А. Клинико- иммуннологические особенности хронической рецидивирующей крапивницы и методы ее диагностики: автореф. дис. ... канд.мед.наук. – М., 2003. – 27с.
12. Система цитокинов: Теоретические и клинические аспекты/ Под ред. В.А.Козлова, С.В. Сенникова. – Новосибирск: «Наука», 2004. – 324 с.
13. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология - М.: Изд-во "Медицина", 2010. - 752 с.
14. Феденко Е.С. // Клинич. иммунология. – 2004. - №8. – С.24-26
15. Частная аллергология / под редакцией Г.Б. Федосеева. – Спб.:Нормед-Издат, 2001. – 464 с.
16. Ferrer M., Luquin E., Sanchez-Ibarrola A. et al. // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2002. – Vol.129, N3. – P.254-260
17. Grattan C., Sabroe R., Graves M. Chronic urticaria