

Удилов В.С., Солдатов Д.А., Базарный В. В., Полушина Л. Г.

Роль фактора роста эндотелия сосудов в иммунопатогенезе хронического описторхоза

ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург

Udilov V.S., Soldatov D.A., Bazarniy V.V., Polushina L.G.

Role of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in the immunopathogenesis of chronic opisthorchosis

Резюме

Описана клиника, гемограмма, биохимические показатели, иммунный статус у 53 пациентов с диагнозом: хронический описторхоз. У 47,2% больных установлено повышение концентрации фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС). Проведено сравнение групп пациентов в зависимости от уровня ФРЭС. Проанализированы взаимосвязи концентрации ФРЭС с показателями клиники, электрокардиограммы, гемограммы, биохимии, фагоцитоза, клеточного, гуморального иммунитета, цитокинами, предшественником мозгового натрийуретического пептида и общим антиоксидантным статусом. ФРЭС следует рассматривать как провоспалительный агент.

Ключевые слова: хронический описторхоз, фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), цитокины

Summary

Described clinic, hemogram, biochemical, immune status in 53 patients with a diagnosis: chronic opisthorchosis. In 47,2% of patients found to increase the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF). A comparison group of patients, depending on the level of VEGF. Analyzed the relationship with the concentration of VEGF indicators clinics, electrocardiogram, hemogram, biochemistry, phagocytosis, cellular, humoral immunity, cytokines, precursor of brain natriuretic peptide (NTproBNP) and the total antioxidant status. VEGF it should be regarded as a proinflammatory agent.

Key words: chronic opisthorchosis, vascular endothelial growth factor (VEGF), cytokines

Введение

В патогенезе хронического описторхоза большое значение придается иммунопатологическим механизмам, поскольку инвазионный процесс является выражением взаимодействия генетически и антигенно-чужеродных организмов [1, 2]. При инвазии, вызванной *opisthorchis felineus*, описаны морфологические и функциональные отклонения в системе кровообращения у взрослых больных [3, 4, 5, 6, 7, 8] и детей [9]. Практически не изучены вопросы патологии сосудистых реакций на молекулярном уровне. Не ясной остаётся роль эффектов биологически активных веществ, в частности, цитокинов на сосудистую стенку, эндо-тели и миокард.

Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС); vascular endothelial growth factor (VEGF) – один из важнейших и специфических факторов, регулирующих процессы ангиогенеза. Физиологические функции VEGF многогранны и одновременно двойственны. VEGF отводят важную роль в поддержании стабильности эндотелия, физиологическом неангиогенезе. Однако VEGF может активно участвовать в процессах неоваскуляризации в патологических ситуациях, в частности в росте атеросклеротической бляшки или опухоли [10, 11, 12].

Может ли паразитарная инвазия оказать свое влияние на продукцию VEGF? Каковы механизмы взаимодействия иммунной и сосудистой систем при хроническом описторхозе? Можно ли прогнозировать течение заболевания на основании поведения VEGF или других кардио- и ангиоспецифических маркеров? Вопросы, на которые в настоящее время нет однозначных ответов.

Остается не до конца изученной проблематика суперинвазионного описторхоза, представляющего собой повторное заражение на фоне имеющейся инвазии *opisthorchis felineus*. Повторные заражения на фоне описторхоза в патогенетическом отношении следует рассматривать как дополнительное воздействие антигенных метаболитов личиночных стадий, усиливающих иммуносупрессивное действие [13].

Цель исследования – изучить взаимосвязи ФРЭС (VEGF) с показателями клиники, электрокардиограммы, гемограммы, биохимии, фагоцитоза, клеточного, гуморального иммунитета, цитокинами, предшественником мозгового натрийуретического пептида и общим антиоксидантным статусом у больных с хроническим описторхозом.

Материалы и методы

В работе представлены материалы и результаты открытого проспективного исследования, проведенного в г. Екатеринбурге в 2014-2015 гг. на базе инфекционного отделения №3 и консультативной поликлиники МАУ «ГКБ № 40».

Под наблюдением находилось 53 человека (18 мужчин и 35 женщин). Средний возраст больных составил $41,9 \pm 1,9$ лет.

Критерии включения:

1. Мужчины и женщины в возрасте старше 18 лет.
2. Диагноз хронического описторхоза, подтвержденный обнаружением яиц *opisthorchis felinus* в кале и/или желчи. Добровольное согласие пациента на дегельминтизацию и лабораторное тестирование.

Критерии исключения:

1. Сопутствующая другая паразитарная патология.
2. Хроническое поражение печени, не обусловленное описторхозом (вирусные гепатиты, аутоиммунный гепатит, метаболические заболевания печени)
3. Больные, имеющие в анамнезе ишемическую болезнь сердца, кардиты, гипертоническую болезнь выше первой стадии, атеросклероз, хроническую сердечную недостаточность, цереброваскулярную патологию.
4. Беременные или кормящие женщины.
5. Острое инфекционное заболевание за три месяца до начала исследования.

Диагноз хронического описторхоза устанавливался на основании клинических, эпидемиологических, копроовоскопических, биовоскопических и серологических данных. Интенсивность инвазии *opisthorchis felinus* определяли копроовоскопически и/или биовоскопически. Копроовоскопию проводили методом толстого мазка по Като с целлофаном и химико-седиментационным методом. У всех 53 человек обнаруживались яйца сибирской двуустки. Средняя интенсивность инвазии составила $15,1 \pm 7,2$ яиц *opisthorchis felinus* в одном грамме фекалий. Методом иммуноферментного анализа проводилось тестирование IgM, IgG к *opisthorchis felinus* с определением титра и определение специфических циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) к *opisthorchis felinus*. Выявлено 8 человек с рецидивирующим течением описторхозной инвазии. Этим больным в анамнезе уже проводилась специфическая терапия препаратом празиквантел, однако дегельминтизации и регресса клиники не достигнуто. У данных больных не исключалась суперинвазионная форма – повторное заражение на фоне уже сформированной инвазии *opisthorchis felinus*.

Всем больным в комплексе параклинического обследования проведено определение общего анализа крови, биохимических показателей сыворотки крови (билирубина, АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, γ ГТП, общего белка, липопротеидов). Биохимические исследования проводились на автоматическом анализаторе «Spectrum-2» фирмы Abbott.

Имунологические исследования проводились на базе МАУ «Клинико-диагностический центр». Параметры общего анализа крови регистрировались с помощью гематологического анализатора Cobas Micros 60

(«АВХ»). Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществляли с использованием моноклональных антител CD3-FITC/CD20-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD16+56-PE («IO Test») методом проточной цитофлюорометрии на цитометре FACScan («Becton Dickinson»). Количество иммуноглобулинов классов M, G, A в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле по G. Mancini. Содержание циркулирующих иммунных комплексов определяли методом преципитации их в 4 % растворе ПЭГ-6000 по V. Haskova в модификации Ю. А. Гриневич. Результаты оценивали в единицах экстинции с помощью спектрофотометрии на аппарате СФ-46. Функционирование НАДФ-оксидазной системы нейтрофилов оценивали при помощи НСТ-теста (тест с нитросиним тетразолием).

Для оценки внутриклеточного киллинга (бактерицидной активности (БА) лейкоцитов, завершенности фагоцитоза) и оценки поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов использовался метод, разработанный в лаборатории Института иммунологии МЗ РФ [14].

Определение концентрации фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкина-4 (IL4), интерлейкина-2 (IL2), интерферона-гамма (IFN γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкина-17 (IL17) N-терминального фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида (NTproBNP) и оценка общего антиоксидантного статуса (TAS) проводились в отделе общей патологии ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ РФ, г. Екатеринбург. Использовался метод, основанный на «эндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моно- и поликлональных антител к VEGF, IL4, IL2, IFN γ , TNF α , IL17, NTproBNP. Интенсивность окрашивания была пропорциональна концентрации содержащегося в образце VEGF, IL4, IL2, IFN γ , TNF α , IL17, NTproBNP. Референтные значения VEGF: 10-246 пг/мл, IL4: 0-4 пг/мл, IL2: < 10 пг/мл, IFN γ : < 15 пг/мл, TNF α : 0-6 пг/мл, IL17: < 5 пг/мл, NTproBNP: 0-200 пг/мл. Оценивался общий антиоксидантный статус (TAS); референтные значения: 1,3-1,8 ммоль/л.

Все иммунологические исследования проводились до начала антигельминтной терапии.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Office» и STATISTICA 6,0 фирмы StatSoft Inc. (США) [15].

Результаты и обсуждение

Повышение концентрации VEGF ($262,5 \pm 28,3$ пг/мл) выявлено у 25 человек (47,2%). Концентрация IL4 ($1,3 \pm 0,05$ пг/мл) сохранялась в пределах референтных значений у большинства пациентов, что может свидетельствовать о не существенной активности Т-хелперов II типа. Вместе с тем, повышение концентрации IL2 ($14,1 \pm 1,8$ пг/мл) регистрировалось у 19 пациентов (35,8%), что не исключает повышение активности Т-хелперов I типа. Подъем концентрации IFN γ до 16,0 пг/мл отмечался только у одного человека. У 31 пациента концентрация IFN γ ($2,02 \pm 0,4$ пг/мл) варьировала от 1 до 12 пг/мл, что не выходило за пределы контрольных значений (< 15 пг/

мл). Увеличение концентрации TNF α фиксировано у 2 чел. Колебания TNF α ($0,98 \pm 0,4$ пг/мл) в пределах референтных значений от 0,4 до 4 пг/мл определялось у 14 пациентов. Рост концентрации IL17 ($1,1 \pm 0,6$ пг/мл) наблюдался у 3 чел. У 1 чел. IL17 не выходил за пределы контрольных цифр. У большинства пациентов ($n=50$) концентрация NTproBNP ($68,5 \pm 9,3$ пг/мл) не выходила за пределы нормальных величин. Повышение уровня NTproBNP определялось у 3 чел. ($210-410$ пг/мл). Снижение показателя TAS выявлено у 41 чел., в то время как увеличение не наблюдалось. В пределах нормы показатель тестировался у 12 чел. Среднее значение TAS составило $1,1 \pm 0,04$ ммоль/л.

Выделены две группы пациентов: группа 1 ($n=25$) с повышением концентрации VEGF и группа 2 ($n=28$) с концентрацией VEGF, не выходящей за пределы референтных значений. В первой группе у больных чаще отмечались боли в суставах, реже выявлялась тяжесть в правом подреберье, фиксированы более низкие значения АЛТ, γ ГТП, ЛПВП, чаще регистрировались воспалительные изменения периферической крови в виде палочкоядерного сдвига ($0,12 \pm 0,02 \cdot 10^9/л$ и $0,05 \pm 0,009 \cdot 10^9/л$; $p < 0,05$), отмечалось большее число гранулоцитов ($3,69 \pm 0,27 \cdot 10^9/л$ и $2,46 \pm 0,32 \cdot 10^9/л$; $p < 0,05$) и абсолютное значение поглотительной способности нейтрофилов ($3,4 \pm 0,27 \cdot 10^9/л$ и $2,2 \pm 0,31 \cdot 10^9/л$; $p < 0,05$), на ЭКГ чаще выявлялось преобладание потенциалов левого предсердия. Несмотря на отсутствие сильной связи интенсивности инвазии, оцениваемой по числу яиц *opisthorchis felineus* с Т-хелперами, обнару-

жена прямая корреляционная зависимость концентрации IL2 и титра IgG к *opisthorchis felineus*, $p < 0,05$ (рис. 1).

У пациентов группы 1 наблюдался значительно более высокий показатель концентрации IL2 ($20,08 \pm 2,93$ пг/мл и $8,68 \pm 1,66$ пг/мл; $p < 0,05$). Наоборот, концентрация IL4 больных группы 1 ниже аналогичного показателя пациентов группы 2 ($1,18 \pm 0,08$ пг/мл и $1,45 \pm 0,05$ пг/мл; $p < 0,05$). Выявлена обратная корреляционная связь концентрации IL2 и IL4; $p < 0,05$ (рис. 2).

При изучении уровня VEGF и цитокинов наблюдалась закономерность, связанная с одновременным повышением IL2 и VEGF, что демонстрирует сильная прямая корреляционная зависимость IL2 и VEGF; $p < 0,05$ (рис. 3). Участвует ли IL2 в стимуляции выработки VEGF однозначно сказать пока невозможно. Не исключено, что имеются общие стимулирующие факторы, действующие как выработку IL2, так и на синтез VEGF.

Продемонстрировано, что воспалительная реакция, связанная с ней-трофилами, ассоциирована с более высокой активностью VEGF; $p < 0,05$ (рис. 4). Полагаем, что повышение числа тромбоцитов одновременно с VEGF; $p < 0,05$ (рис. 5), вероятно, опосредовано через тромбоцит активирующий фактор (PAF).

Отметим, возможно, связанную с участием IL2, повышенную активность NK-клеток, что демонстрируют взаимосвязи, отраженные на рисунках 6 и 7 ($p < 0,05$).

При оценке общего антиоксидантного статуса наблюдалась межгрупповая разница. Показатель TAS по-

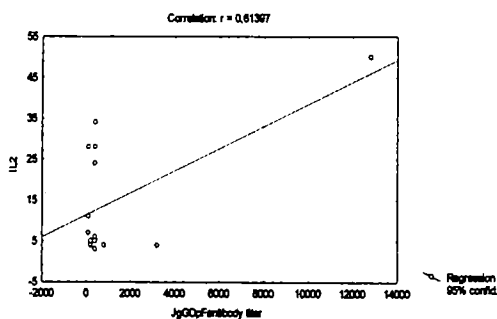


Рисунок 1. Корреляция IL2 и титра IgG к *opisthorchis felineus*.

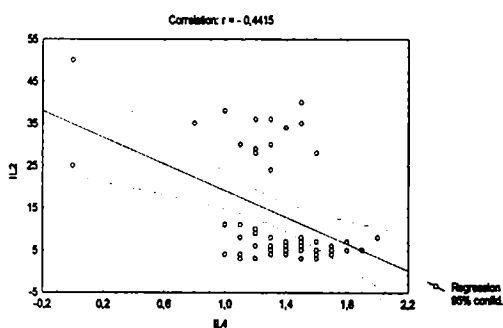


Рисунок 2. Корреляция IL2 и IL4.

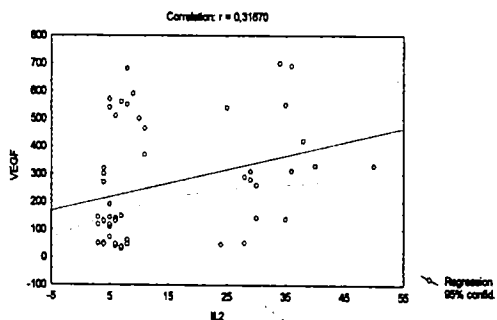


Рисунок 3. Корреляция VEGF и IL2.

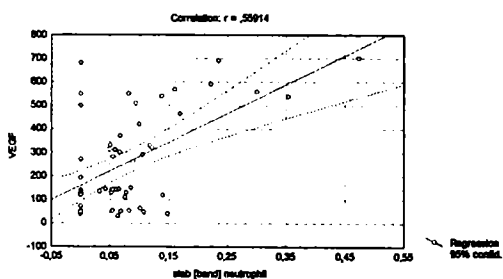


Рисунок 4. Корреляция VEGF и палочкоядерных нейтрофилов

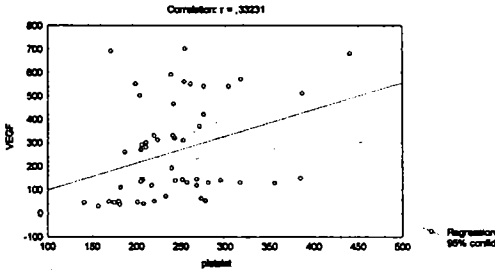


Рисунок 5. Корреляция VEGF и тромбоцитов

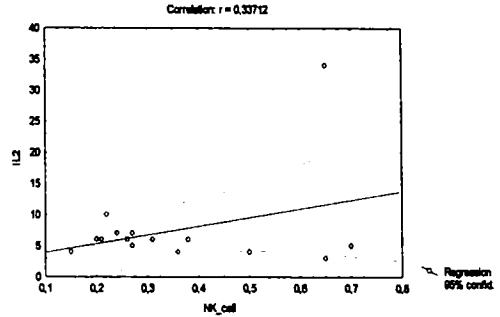


Рисунок 6. Корреляция NK-клеток, абс. и IL2.

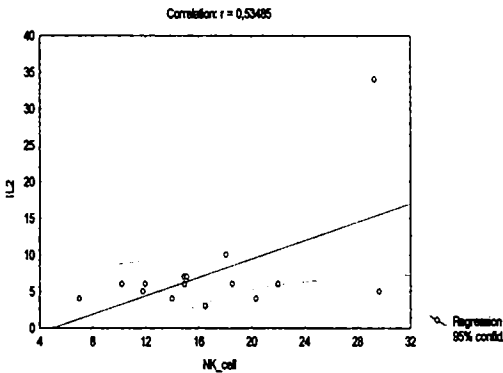


Рисунок 7. Корреляция NK-клеток, % и IL2.

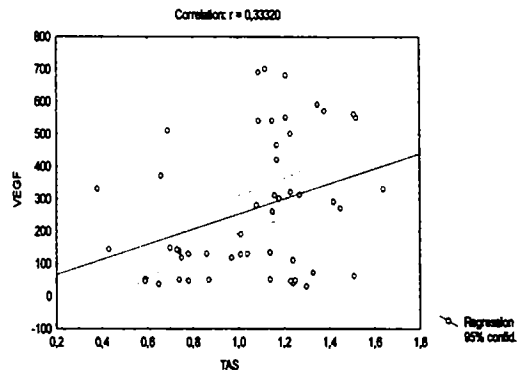


Рисунок 8. Корреляция TAS и VEGF

нижался преимущественно во второй группе ($1,18 \pm 0,06$ ммоль/л и $0,95 \pm 0,05$; $p < 0,05$). Выявлена прямая корреляционная зависимость VEGF и TAS; $p < 0,05$ (рис. 8).

У пациентов с суперинвазивной формой описторхоза существенной разницы по концентрации VEGF не отмечено ($p > 0,05$). Больные суперинвазией *opisthorchis felipeus*, чаще жаловались на боль в животе, у них чаще выявлялась гипертрофия левого желудочка, снижалось число Т-лимфоцитов ($1,07 \pm 0,14 \cdot 10^9/\text{л}$ и $1,64 \pm 0,11 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$), Т-хелперов ($0,62 \pm 0,10 \cdot 10^9/\text{л}$ и $1,02 \pm 0,07 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$), моноцитов ($0,41 \pm 0,05 \cdot 10^9/\text{л}$ и $0,59 \pm 0,04 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$), отмечалось повышение спонтанного НСТ ($24,75 \pm 12,9\%$ и $3,82 \pm 1,38\%$; $p < 0,05$) и стимулированного НСТ ($38,0 \pm 12,85\%$ и $17,45 \pm 3,25\%$; $p < 0,05$). Среди больных суперинвазивным описторхозом оказались пациенты с повышенным значением NTproBNP ($148,63 \pm 47,68$ пг/мл и $54,29 \pm 5,17$ пг/мл; $p < 0,05$). О прогностическом значении NTproBNP говорить преждевременно, ввиду немногочисленной группы пациентов. Для более детального анализа роли ангио- и кардиоспецифических агентов потребуются более масштабные исследования.

Выводы

1. При хроническом описторхозе у 47,2% пациентов повышается концентрация в крови фактора роста эндотелия сосудов ФРЭС (VEGF).

2. Подъем ФРЭС (VEGF) ассоциирован с воспалительными изменениями периферической крови, активностью фагоцитоза, увеличением числа тромбоцитов, повышением концентрации интерлейкина-2, стойкостью антиоксидантного статуса.

3. ФРЭС (VEGF) можно рассматривать как дополнительный провоспалительный агент, обеспечивающий адекватный ответ организма хозяина на гельминт.

4. При суперинвазивной форме описторхоза роль ФРЭС (VEGF) менее значима, а прогностический приоритет следует отдать другим биологическим активным агентам, к числу которых возможно относится предшественник мозгового натрийуретического пептида (NTproBNP).■

Удилов В.С., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМУ РФ, г. Екатеринбург; Салдатов Д.А., заочный аспирант, ассистент кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии ГБОУ ВПО УГМУ РФ, г. Екатеринбург; Базарный В.В., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела общей патологии ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ РФ, г. Екатеринбург; Полушина Л.Г., научный сотрудник отдела общей патологии ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ РФ, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку – Удилов Виталий Станиславович, 620102, г. Екатеринбург, ул. Волгоградская, 189, e-mail: 75vit@mail.ru

Литература:

1. Озерецковская Н.Н., Шуйкина Э.Е., Парфенов С.Б. Толерантность к антигенам описторхисов: иммунитет или генетика? // Описторхоз. Современное состояние проблемы, перспективы развития: Сб. тез. Юбилейной конф. – Тюмень, 1991. – С. 171 – 174.
2. Шонин А.Л. Клинико-иммунологическая характеристика резидуальной фазы описторхоза / А.Л. Шонин // Авто-реф. дис. ... канд. мед. наук. – Тюмень. – 1998. – 26 с.
3. Берендеева Е.П. Диастолическая дисфункция левого желудочка и состояние кардиохронотропной регуляции у больных псориазом в сочетании с хроническим описторхозом / Е.П. Берендеева // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск. – 2008. – 24 с.
4. Крылов Г.Г. Кардиальный синдром при описторхозе / Г.Г. Крылов // Мед. паразитология и паразитарные болезни. – 2004. – т. 3. – С. 27-29.
5. Посохов И.Н. Состояние миокарда при хроническом описторхозе / И.Н. Посохов // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск. – 1997. – 21 с.
6. Ратынская И.А. Гемодинамика малого круга кровообращения у больных хронической обструктивной болезнью легких в эндемическом очаге описторхоза / И.А. Ратынская // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Омск. – 2004. – 23 с.
7. Суркова Л.Г. Состояние диастолической функции левого желудочка и кардиохронотропной регуляции у больных хроническим гломерулонефритом в сочетании с хроническим описторхозом / Л.Г. Суркова // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск. – 2005. – 25 с.
8. Тюкалова Л.И. Структурно-функциональное поражение сердечно-сосудистой системы при хроническом описторхозе / Л.И. Тюкалова // Дис. ... д-ра мед. наук. – Томск. – 1999. – 270 с.
9. Каплюк А.А. Функциональное состояние миокарда и возможные причины его повреждения у детей с хроническим описторхозом / А.А. Каплюк // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск. – 2007. – 25 с.
10. Семенова А.Е., Сергиенко И.В., Габрусенко С.А. Объемные методы оценки коронарного ангиогенеза // Кардиология. – 2008. – т. 6. – С. 19-23.
11. Siervo M., Ruggiero D., Sorice R. et al. Angiogenesis and biomarkers of cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome // J. Intern. Med. – 2010. – 268(4). – 338-47.
12. Siervo M., Ruggiero D., Sorice R. et al. Body mass index is directly associated with biomarkers of angiogenesis and inflammation in children and adolescents // Nutrition. – 2012. – 28(3). – 262-6.
13. Крылов Г.Г. Суперинвазионный описторхоз: патогенез и морфогенез осложненных форм и микст-патологии / Г.Г. Крылов // Дис. ... д-ра мед. наук. – Москва. – 2005. – 84 с.
14. Хаитов Р.М. Современные представления о защите организма от инфекции / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2000. – т. 1. – С. 62-64.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера, 2002. – 294 с.