

*Шипилов М.В.*

## "Цитокиновый шторм" при гриппе: перспективы диагностики

ГОУ ВПО "Смоленский государственный университет", г. Смоленск

*Shipilov M.V.*

### "Cytokine storm" of the influenza: Prospects for diagnosis

#### Резюме

Цель работы: создание экспертных систем "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ" и "Нарушения функционирования цитокиновой сети у больных ОРВИ", предназначенных в первую очередь для диагностики цитокинового шторма у больных гриппом и другими ОРВИ с учетом комплекса клинических и лабораторных данных. Разработанные экспертные системы работают в среде Windows 2000/XP/Vista/7. Они построены на основе алгоритма дедуктивного нечеткого логического вывода, использующего базу нечетких продукционных правил, полученных экспертным методом. Описаны результаты тестирования и перспективы совершенствования. Экспериментальное исследование показало высокую эффективность экспертных систем в медицинской практике.

**Ключевые слова:** грипп, ОРВИ, цитокины, цитокиновый шторм, экспертная система, прогноз

#### Summary

Objective: creation of expert systems "Quick diagnosis and prognosis of ARVI" and "Violations of the cytokine network functioning in patients with ARVI", intended primarily for the diagnosis of the cytokine storm in patients with influenza and other acute respiratory viral infection, taking into account the complex clinical and laboratory data. Developed expert systems operate in Windows 2000/XP/Vista/7. They are based on algorithms of deductive fuzzy inference using fuzzy base of production rules obtained by the expert. Testing is described and the prospects for their improvement. Experimental research has shown high efficiency of expert systems in medical practice.

**Keywords:** influenza, ARVI, cytokines, cytokine storm, expert system, prognosis.

#### Введение

Цитокины представляют собой низкомолекулярные белки, которые вырабатываются преимущественно эффекторными клетками крови в месте воспаления, основная функция которых состоит, прежде всего, в контроле процессов клеточного гомеостаза [1]. Однако эффекты этих регуляторных белков не только локальны, их действие распространяется на весь организм, причем даже в минимальных (пикограммовых) концентрациях [1, 2]. В настоящее время известно около 100 цитокинов, уровень которых в периферической крови может быть повышен при многих заболеваниях, в ряде случаев превышая нормальную концентрацию в десятки и сотни раз. В таких случаях развивается достаточно своеобразная клинико-лабораторная картина под названием "цитокиновый шторм (буря)", подчёркивающим чрезвычайно бурную реакцию клеток иммунной системы, связанную с гиперпродукцией ими преимущественно провоспалительных цитокинов [3, 4, 5].

У больных ОРВИ цитокиновый шторм впервые был описан при гриппе H5N1 [3, 5, 6], причем Jong

M.D. с соавторами (2006) [5] прямо проводят связь между тяжёлым, и подчас, смертельным течением птичьего гриппа и гиперцитокинемией. В литературе также имеются отдельные наблюдения гиперцитокинемии при гриппе pH1N1 [4, 7], сопровождающейся у всех наблюдаемых больных резко выраженной лимфоцитопенией [8, 9]. Механизм патологического действия повышенного уровня ряда провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6) при тяжёлом течении гриппа в настоящее время объясняется запуском трипсин/ММР-9 цикла в клетках многих органов и тканей, особенно в эндотелиоцитах, что приводит к разрушению матрикса вокруг микрососудов, увеличению сосудистой проницаемости (развитием отёка) с подавлением в клетках продукции аденозинтрифосфата, что приводит к "энергетическому кризису клеток" [10]. Помимо этого, повышенный уровень провоспалительных цитокинов связывают с резким изменением липидного и углеводного обмена клеток, а также с активацией рецепторов, стимулирующих пролиферацию клеток под действием пероксисом (PPAR) [11].

До настоящего времени остаётся недостаточно ясным роль конкретных цитокинов в развитии цитокинового шторма при гриппе, особенно это касается его главных «участников». Так, на модели тяжёлого течения гриппа А у мышей было отмечено резкое повышение уровня  $IFN-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  с развитием цитокинового шторма с полиорганной недостаточностью [12]. Другие исследователи так определяют основных факторов в развитии цитокинового шторма при гриппе:  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$  и хемокины, основным из которых является  $IL-8$  [9, 13]. При исследовании цитокинового профиля больных гриппом H5N1 было отмечено повышение концентрации в крови многих цитокинов ( $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IFN-\alpha/\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-1$ ,  $MIG$ ,  $IP-10$ ,  $MCP-1$ ,  $RANTES$ ,  $IL-8$ ) в связи с их гиперпродукцией макрофагами и Т-лимфоцитами, однако автор посчитал наиболее важными и определяющими всю клиническую картину осложнённого течения только три цитокина:  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$  и  $IFN-\gamma$  [3]. При исследовании больных тяжёлым течением гриппа рН1N1 была отмечена резко выраженная лимфоцитопения и значительное повышение в периферической крови уровня  $IL-12$ ,  $IL-15$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-9$ . Причем уровни  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-15$  и  $TNF-\alpha$  в крови больных тяжёлым течением гриппа рН1N1, прямо коррелирующими с уровнем С-реактивного белка, были достоверно выше, чем при среднетяжёлом течении [9]. Согласно J. F. Vermejo-Martin с соавторами (2009) [8], наиболее значительно повышенными у больных гриппом рН1N1, находящимися в критическом состоянии, являются  $IL-6$ ,  $IL-12$ ,  $IL-15$ ; именно их авторы и рекомендуют определять для оценки прогноза заболевания. Согласно нашим исследованиям, у больных тяжёлой формой гриппа рН1N1 выявлено повышение уровня  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-18$ ,  $IFN-\alpha$  и  $IFN-\gamma$ , именно уровень этих цитокинов необходимо прежде всего использовать в качестве критериев тяжёлого течения гриппа [14, 15, 16].

Т.о., в результате проведенных исследований было показано, что у больных гриппом в той или иной степени выявляется нарушение функционирования «цитокиновой сети», связанное с изменением активности эффекторных клеток крови (моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов и др.), которое часто приходит к норме к периоду реконвалесценции [8, 9, 16]. Однако в ряде случаев (например, при тяжёлом течении гриппа рН1N1) активность иммунокомпетентных клеток усиливается настолько, что происходит неконтролируемая выработка ими преимущественно мощных провоспалительных цитокинов, которые в большом количестве приводят к нарушению функционирования различных органов и тканей, прежде всего к поражению лёгких с развитием острого респираторного дистресс-синдрома, а также полиорганной недостаточности – цитокиновому шторму [3, 4, 5, 13].

Проблема диагностики цитокинового шторма, особенно его ранних клинико-лабораторных признаков, в настоящее время стоит достаточно остро. В доступной нам литературе не оказалось работ по диагностике данного патологического состояния с учётом комплекса клинических и лабораторных данных с последующим созданием на базе этих данных диагностических компьютерных программ.

## Материалы и методы

В связи с отсутствием компьютерных программ по диагностике и прогнозу течения цитокинового шторма при гриппе нами было принято решение разработать экспертные системы (ЭС) для выявления первых признаков усиления активности иммунокомпетентных клеток, исходя из клинических данных, а также уровня 12 провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, наиболее часто встречающихся в литературе по изучению цитокинового профиля у больных гриппом, в том числе и при тяжёлом его течении. В основу были положены результаты исследования методом иммуноферментного анализа коммерческими тест-системами ЗАО "Вектор-Бест" (Россия) сыворотки крови больных гриппом рН1N1 и гриппом А/Н3N2, парагриппом, аденовирусной инфекцией, респираторно-синцитиальной инфекцией в сравнении с практически здоровыми лицами [14, 15, 16].

Рассматриваемые ЭС построены на основе алгоритма дедуктивного нечеткого логического вывода, использующего базу нечетких продукционных правил, полученных экспертным методом. Данная модель позволяет представлять как декларативные, так и процедурные знания. Кроме того, использование нечеткости при построении условных высказываний позволяет формально включать в них знания экспертов, выраженные вербальными категориями типа "много", "средне", "мало", "часто", "вероятно", "приблизительно столько-то" и т.п. [17, 18].

Разработанные ЭС получили название: "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ" (Рисунок 1) и "Нарушения функционирования цитокиновой сети у больных ОРВИ". Данные ЭС работают в среде Windows 2000/XP/Vista/7. Интерфейс прост в использовании и может быть легко освоен врачами, владеющими лишь азами компьютерной грамотности (Рисунок 1).

Для составления базы знаний ЭС привлекались ведущие врачи-инфекционисты высшей категории. Рассмотренные ЭС могут применяться как по отдельности, решая частные задачи, так и совместно, позволяя комплексно осуществлять поддержку принятия решений при диагностике и лечении ОРВИ. При совместной работе имеется возможность обмена данными между ЭС, что существенно сокращает время на ввод информации.

Входные данные, вводимые для работы ЭС, следующие (Рисунок 2):

1. Основные данные о пациенте: пол (м, ж), возраст (15-90 лет), масса тела, рост, беременность (да, нет), ожирение (нет, I степень, II степень, III степень, IV степень), хронические болезни внутренних органов нет/да (дыхательной системы, сердца, почек, печени), сведения о проведенной вакцинации против гриппа в данном сезоне (привит, не привит), принимал ли препарат для профилактики ОРВИ (да, нет), интервал между днем начала болезни и днем обращения к врачу (0-10 дней).
2. Начало болезни (внезапное, острое, подострое, постепенное).
3. Данные осмотра: состояние пациента (лёгкое, средней тяжести, тяжёлое, крайне тяжёлое), жало-

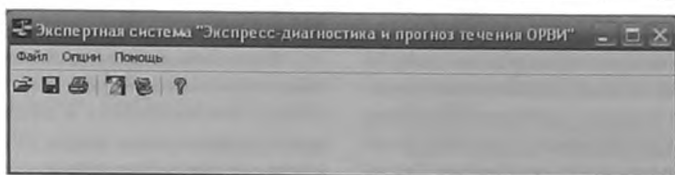


Рис. 1. Главная форма программы "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ".

**Основные данные о пациенте**

Пол:  Понимание:  Наличие хронических заболеваний внутренних органов:  Дыхательная система,  Сердце,  Печень,  Почка

Возраст:  Влажность протеи грита:  Препинал ли препарат для профилактики:  Начало болезни:  Интервал между днями начала болезни и днями обращения к врачу (дней):

**Данные осмотра**

Состояние пациента:  Пульс:  Цианоз:  Лицо:  Катаральный синдром:  Наличие конъюнктивита:  Увеличение лимфатических узлов:  Увеличение печени:  Увеличение селезенки:  Силь:  Температура тела (град. Цельсия):

**Жалобы**

Боль и тяжесть в груди  
 Чувство "нехватки воздуха"  
 Головная боль  
 Тошнота  
 Рвота  
 Диарея  
 Боли в мышцах  
 Насморк  
 Кашель

**Рентгенография органов грудной клетки**

**Концентрация цитокинов в сыворотке крови при обследовании (в остром периоде заболевания)**

ФНО-альфа (пг/мл)	20.1	РМЛ (пг/мл)	1420	ИЛ-8 (пг/мл)	107.5
ИФН-гамма (пг/мл)	23.6	ИЛ-2 (пг/мл)	12.3	ИЛ-10 (пг/мл)	12.6
ИФН-альфа (пг/мл)	10.4	ИЛ-4 (пг/мл)	0.2	ИЛ-17 (пг/мл)	2.4
ИЛ-1 бета (пг/мл)	4.5	ИЛ-6 (пг/мл)	11.3	ИЛ-18 (пг/мл)	574.8

**Лабораторные исследования**

**Общий анализ крови**

Количество эритроцитов (E+12/л)	3.2
Уровень гемоглобина (г/л)	100.5
Цветной показатель	0.95
Количество тромбоцитов (E+9/л)	234.2
Количество лейкоцитов (E+9/л)	10.3
Количество базофилов (%)	3.2
Количество эозинофилов (%)	7.3
Количество моноцитов (%)	10.4
Количество сегментоядерных нейтрофилов (%)	74.2
Количество лимфоцитов (%)	36.8
Количество моноцитов (%)	20.0
Скорость оседания эритроцитов (мм/час)	25.6

**Общий анализ мочи**

Наличие протеинурии (белок в моче, г/л):

**Биохимическое исследование крови**

Белок (г/л)	70.3	Билирубин общий (мкмоль/л)	3.3
Мочевина (ммоль/л)	15.2	АЛТ (вд/л)	20.4
Креатинин (ммоль/л)	100.4	АСТ (вд/л)	15.3
Глюкоза (ммоль/л)	5.2		

Группа крови больного:  Резус-фактор:

Готово

Рис.2. Ввод данных в ЭС "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ" и в ЭС «Нарушения функционирования цитокиновой сети у больных ОРВИ».

бы (боль и тяжесть в груди, чувство "нехватки воздуха", головная боль, тошнота, рвота, насморк, кашель, боли в мышцах, диарея), кровохарканье (да, нет), температура тела, цианоз (да, нет), лицо (гиперемировано, бледное), катаральный синдром (ринит, фарингит, ларингит, трахеит, бронхит), пульс, артериальное давление (систолическое, диастолическое), частота дыхательных движений, влажные хрипы в лёгких (да, нет), крепитация в лёгких (да, нет), конъюнктивит (да, нет), увеличение лимфатических узлов (да, нет), увеличение печени (да, нет), увеличение селезёнки (да, нет), сыпь (да, нет).

4. Лабораторные исследования: общий анализ крови (количество эритроцитов, уровень гемоглобина, цветной показатель, количество тромбоцитов, количество лейкоцитов, количество базофилов, количество эозинофилов, количество палочкоядерных нейтрофилов, количество сегментоядерных нейтрофилов, количество лимфоцитов, количество моноцитов, скорость оседания эритроцитов), общий анализ мочи (наличие протеинурии), биохимическое исследование крови (белок, мочевина, креатинин, глюкоза, билирубин, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза), группа крови больного (I-IV группа), резус-фактор (положительный, отрицательный).

5. Результаты рентгенографии органов грудной клетки (в пределах нормы, расширение корней лёгких, сегментарная пневмония, долевая пневмония, двусторонняя пневмония, тотальная двусторонняя пневмония).

6. Концентрация цитокинов в сыворотке крови при обследовании больных в остром периоде заболевания (диапазон изменений указан в скобках, пг/мл): TNF- $\alpha$  (0–51,4), IFN- $\gamma$  (0–128,4), IFN- $\alpha$  (0–500), IL-1 $\beta$  (0–163,3), IL-1Ra (0–3000), IL-2 (0–64,7), IL-4 (0–3,801), IL-6 (0–300), IL-8 (0–250), IL-10 (0–44,958), IL-17 (0–13,177), IL-18 (0–1000).

## Результаты и обсуждение

Экспериментальное исследование ЭС, проведенное на данных 83 пациентов, показало, что вероятность постановки правильного диагноза и состояния цитокинового шторма (1-10 баллов) составила более 95%. При этом время на постановку предварительного диагноза составило всего лишь несколько часов (до суток, с учетом использования комплекса лабораторных и инструментальных данных).

Отдельно исследовалась достоверность экспресс-диагностики – способность метода отличать здоровых людей от больных. Она включает два компонента: чув-

ствительность и специфичность. Чувствительность – способность метода правильно определять тех, у кого болезнь есть. Она измеряется долей положительных результатов у действительно больных – долей истинноположительных результатов. Специфичность – способность метода правильно определять, у кого нет болезни. Она измеряется долей истинноотрицательных результатов – отрицательных результатов у здоровых людей. Исследование показало: чувствительность близка к 100%, специфичность более 95%.

Отличительными особенностями обоих разработанных ЭС явился учет концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных, характеризующий состояние иммунной системы («цитокиновой сети») и её реакцию на внедрение и размножение вируса в виде неоднозначных изменений активности эффекторных клеток крови (моноцитов, макрофагов, нейтрофилов и Т-лимфоцитов), что прямо связано с тактикой лечения и прогнозом. К тому же, в ЭС отдельным диагнозом был введен грипп рН1N1 (пандемический высоковирулентный грипп), характеризующийся тяжелым течением заболевания, а также более выраженным дисбалансом функционирования цитокиновой сети [16].

Более того, в программе "Нарушения функционирования цитокиновой сети у больных ОРВИ" нами впервые было введено понятие "уровень цитокинового шторма", косвенно отражающее активность эффекторных клеток крови и измеряемое в баллах по 10-бальной шкале с помощью изучения уровня и динамики провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови, измеряемый по десятибальной шкале (0 – отсутствие изменений цитокиновой сети, 1-3 – изменение концентрации цитокинов, соответствующее лёгкой форме ОРВИ, 4-8 – среднетяжёлая форма ОРВИ и возможность развития цитокинового шторма, 9-10 – тяжёлая форма ОРВИ с высокой вероятностью летального исхода, цитокиновый шторм).

## Заключение

Определенные в эксперименте вероятность постановки правильного диагноза и состояния цитокинового шторма, чувствительность и специфичность дают возможность использовать данную ЭС в качестве скрининг-метода для диагностики гриппа и других ОРВИ и оценки прогноза течения, что, по нашему мнению, может способствовать уменьшению числа диагностических ошибок, особенно среди врачей неинфекционных специальностей.

В настоящее время ведутся работы по двум направлениям совершенствования описанных ЭС. Во-первых, модифицируются базы знаний ЭС, что позволит улучшить качество их работ. Во-вторых, разрабатываются сетевые версии ЭС, как для работы в локальной сети крупных медицинских учреждений (поликлиник, больниц, центров), так и удаленной работы через сеть Интернет. В последнем случае для использования ЭС врачу достаточно иметь лишь стационарное или мобильное устройство для просмотра web-страниц. Зайдя на сайт ЭС и авторизовавшись под своим именем и паролем, врач получает доступ ко всем функциям ЭС, работающим на удаленном сервере. Это особенно актуально, для медицинских работников, проживающих в удалённых от городов населённых пунктах, а также для врачей «Скорой помощи», прибывшие к пациенту без возможности проведения лабораторных исследований или с их минимальным набором, что, по нашему мнению, должно улучшить качество диагностики.■

*Шипилов М.В., к.м.н., доцент кафедры психологии ГОУ ВПО "Смоленский государственный университет", г. Смоленск; Адрес для переписки - 214031, г. Смоленск, проспект Строителей, дом 14-В, кв. 11, тел.: 8(951)6944168, E-mail: mshipilov@front.ru, mshipilov@rambler.ru*

## Литература:

1. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление 2002; 1: 9-17.
2. Нагоев Б.С., Нагоева М.Х., Камбачокова Э.А. О роли цитокинов в регуляции иммунной системы при инфекционных заболеваниях. Материалы III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням; 2011 сентябрь 28-30; Москва; Инфекционные болезни 2011; 9 (Приложение 1): 260.
3. Us D. Cytokine storm in avian influenza. Mikrobiyol Bul 2008; 42 (2): 365-80.
4. Cheng X.W., Lu J., Wu C.L. et al. Three fatal cases of pandemic 2009 influenza A virus infection in Shenzhen are associated with cytokine storm. Respir Physiol Neurobiol 2011; 175 (1): 185-7.
5. Jong M.D., Simmons C.P., Thanh T.T. et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. Nat Med 2006; 12: 1203-7.
6. Wong S.S., Yuen K.Y. Avian influenza virus infections in humans. Chest 2006; 129 (1): 156-68.
7. Yokoyama T., Tateishi K., Tushima K. et al. A case of severe ARDS caused by novel swine-origin influenza (A/H1N1pdm) virus: a successful treatment with direct hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber. J Clin Apher 2010; 25 (6): 350-3.
8. 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; 13(6): R201.
9. Hagau N., Slavcovici A., Gongnanu D.N. et al. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. Crit Care 2010; 14(6): R203.
10. Kido H., Chida J., Yao M., Wang S. Mechanisms of

- multi-organ failure in severe influenza. *Nippon Rinsho* 2010; 68 (8): 1565-73.
11. Bassaganya-Riera J., Song R., Roberts P.C. et al. PPAR-gamma activation as an anti-inflammatory therapy for respiratory virus infections. *Viral Immunol* 2010; 23 (4): 343-52.
  12. Wang S., Le T.Q., Kurihara N. et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J Infect Dis* 2010; 202 (7): 991-1001.
  13. Salomon R., Hoffmann E., Webster R.G. Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (30): 12479-81.
  14. Шипилов М.В. Исследование уровня фактора некроза опухоли- $\alpha$  при острых респираторных вирусных инфекциях. Ученые записки Орловского государственного университета 2011; 3: 291-5.
  15. Шипилов М.В. Концентрация интерлейкина-18 у больных острыми респираторными вирусными инфекциями. *Якутский медицинский журнал* 2011; 34 (2): 64-6.
  16. Шипилов М.В., Волчкова Е.В., Кутарев Ф.Л. Цитокиновый профиль у больных гриппом рН1N1. Материалы III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням; 2011 сентябрь 28-30; Москва; *Инфекционные болезни* 2011; 9 (Приложение 1): 410-1.
  17. Круглов В.В., Длин М.И. Интеллектуальные информационные системы: компьютерная поддержка систем нечеткой логики и нечеткого вывода. М: Издательство Физико-математической литературы; 2002.
  18. Усков А.А., Кузьмин А.В. Интеллектуальные технологии управления. Искусственные нейронные сети и нечеткая логика. М: Горячая Линия; 2004