



Иммунологические нарушения и их терапия у пациентов с черепно-мозговой травмой

Э.М. Мамытова

Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан

В данной работе представлены результаты клинического исследования, целью которого явилось изучение влияния препарата «Церебролизин» на состояние цитокинового профиля и клеточного иммунитета у больных в раннем посттравматическом периоде со средне-тяжёлой черепно-мозговой травмой (ЧМТ).

Терапия церебролизином обусловила положительные изменения среди показателей клеточного иммунитета и частичную коррекцию возникшего после ЧМТ Т-клеточного иммунодефицита. Через 10 дней после проведённого лечения церебролизином наблюдался рост противовоспалительного цитокина IL-4 (до лечения $2,0 \pm 0,5$ пг/л, после – до $2,8 \pm 0,4$ пг/л), что в 2,1 раза выше референтной нормы; уровень провоспалительных цитокинов ФНО- α ($5,8 \pm 0,7$ пг/мл; $6,2 \pm 0,7$ пг/л); IL-6 ($21,2 \pm 5,0\%$; $28,7 \pm 13,6\%$), что в 3,7 раза выше физиологической нормы, а IFN- γ и IL-1 – имели тенденцию к снижению: IFN- γ – от $79,6 \pm 16,2$ до $69,3 \pm 6,9$; IL-1 – $9,1 \pm 2,0$ пг/мл и $7,3 \pm 1,6$ пг/мл.

Анализ динамики Т-клеточного иммунитета на 10 день лечения церебролизином выявил увеличение процентного содержания CD3+ (от $34,3 \pm 1,4\%$ до $41,2 \pm 2,7\%$) и CD4+ (от $20,4 \pm 1,2\%$ до $21,5 \pm 2,2\%$) субпопуляций Т-лимфоцитов.

Использование в комплексе лечения больных с ЧМТ церебролизина, обладающего нейротропным, нейротрофическим и иммуномодулирующим эффектом, позволяет уменьшить проявления иммунодепрессии и, таким образом, снизить частоту гнойно-септических осложнений.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, цитокины, субпопуляции лимфоцитов, церебролизин, иммунитет

Актуальность. Характерной особенностью течения острого периода травматических повреждений головного мозга является развитие иммунологических дисфункций и сопутствующих им гнойно-септических осложнений.

Наиболее часто выявляют развитие Т-клеточных дисфункций, зависимых от баланса про- и противовоспалительных цитокинов, изучение которых по-прежнему остаётся актуальной проблемой [1,2].

Выявление нарушений иммунного статуса больных и их своевременная коррекция в раннем посттравматическом периоде черепно-мозговой травмы (ЧМТ) может способствовать более эффективному восстановительному периоду и повысить качество жизни пациентов.

ЧМТ приводит к существенным побочным эффектам, связанным со снижением функциональной активности иммунокомпетентных клеток [3].

С учётом того, что одной из причин расстройств иммунитета у больных с ЧМТ является нарушение регулирующей функции центральной нервной системы (ЦНС), в настоящее время разрабатываются принципы нейроиммунокоррекции и нейроиммунотерапии. Нейроиммунокоррекция представляет собой воздействие на патологически изменённую нейроиммунную систему с целью её восстановления и складывается из комплекса мер, повышающих и нормализующих активность нейроиммунной системы в условиях поражения центральной нервной системы [6-9].

Для такой нормализации применяется комплекс мер, состоящих из коррекции гормонального статуса, недостаточности гипоталамо-гипофизарно-адренальной системы, метаболической нейротрофической (антигипоксанты, антиоксиданты и нейротрофические лекарственные препараты), цитокинотерапии, а также иммунокоррекции индивидуально подобранными иммунопрепаратами, прежде всего иммуномодуляторами [2].



Одним из препаратов, обладающих нейроиммунорегулирующим действием, является препарат «Церебролизин» («Ebewe», Австрия), поскольку он содержит удачную комбинацию нейроактивных аминокислот, микроэлементов и нейропептидов с нейротрофическими и иммуномодулирующими свойствами [1,5].

Цель исследования: изучение реакции иммунной системы при черепно-мозговой травме, а также терапевтического действия церебролизина у больных со средне-тяжёлой ЧМТ в остром периоде.

Материал и методы. Для достижения поставленной цели, нами на базе 1 и 2 отделений нейротравмы НГ МЗ КР (г.Бишкек) было проведено комплексное обследование 10 больных с ЧМТ средне-тяжёлой степени в остром периоде. Средний возраст пострадавших $38,0 \pm 1,9$ года.

Критерии включения: диагноз ушиб головного мозга средней степени тяжести в остром периоде травмы; отсутствие соматической патологии; отсутствие эпилептических припадков; согласие пациента или его родственника на участие в исследовании. Основную группу составили пациенты, которые получали базовую терапию с добавлением к ней нейропротектора – церебролизина – по 5 мл, вводимого в/в, капельно в 100 мл физиологического раствора в течение 10 дней.

В контрольную группу вошли 20 доноров, сопоставимых по полу и возрасту с больными основной группы.

Исследование состояния иммунного статуса проводили на 1-10 сутки с момента начала терапии по показателям клеточного звена иммунитета периферической крови. Диагностика ЧМТ и её лечение соответствовали требованиям Протокола оказания медицинской помощи при ЧМТ, утверждённым Министерством здравоохранения КР.

Исследование состояния иммунного статуса и цитокинового профиля проводили до и после лечения церебролизинем на 1 и 10 сутки.

Исследовали уровень цитокинов сыворотки крови (интерлейкины IL-1 β ; IL-4; IL-6; ФНО- α , IFN- γ) с помощью иммуноферментных тест-систем производства фирмы «Вектор Бест» (г. Новосибирск).

Фенотипическую характеристику субпопуляций лимфоцитов выполняли с помощью моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Россия), в непрямом иммунофлуоресцентном тесте. В работе использовали следующие моноклональные антитела: СД3 – для определения Т-лимфоцитов; СД4 – для определения Т-хелперов; СД8 – для определения Т-супрессоров – цитотоксических лимфоцитов; СД16 – для определения натуральных киллеров; СД20 – для определения В-лимфоцитов, ИРИ – для определения иммунорегуляторного индекса, СД95 – для определения активированных лимфоцитов. Полученные из крови больных моноклональные метил- и моноклональные антитела, согласно рекомендации и инструкции фирмы-изготовителя в объёме 0,1 мл, учитывали их реакции на проточном цитофлуориметре Vecton Diskinson.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ STATISTICA 6.0. Значимость различий средних значений показателей устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средних арифметических и стандартных отклонений ($M \pm SD$).

Результаты и их обсуждение. При введении церебролизина у пациентов нежелательных явлений не отмечалось. Спектр провоспалительных (IL-1,6, IFN- γ и ФНО- α) и противовоспалительного (IL-4) цитокинов определяли у всех обследуемых больных с ЧМТ. В таблице 1 представлены данные по определению динамики цитокинов в сыворотке крови до и после лечения церебролизинем.

Содержание IL-1 β в сыворотке крови до лечения церебролизинем было повышенным в 2,7 раза ($P < 0,01$) от показателя нормы, и равнялось $9,1 \pm 2,0$ пг/мл, что, очевидно было связано с особенностями этого цитокина как «стартового» при любом воспалении [9]. Через 10 дней лечения концентрация этого цитокина снизилась незначительно по сравнению с исходными значениями (до $7,3 \pm 1,6$ пг/мл).

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЧМТ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРЕБРОЛИЗИНОМ (пг/мл)

Показатель	До лечения (n=10)	После лечения (n=10)	Доноры (n=20)
IL-1	$9,1 \pm 2,0$ ($P < 0,01$)	$7,3 \pm 1,6$ ($P < 0,02$)	$3,3 \pm 0,4$
IL-4	$2,0 \pm 0,5$ ($P < 0,1$)	$2,8 \pm 0,4$ ($P < 0,001$)	$1,3 \pm 0,2$
IL-6	$21,2 \pm 5,0$ ($P < 0,001$)	$28,7 \pm 13,6$ ($P < 0,05$)	$3,0 \pm 0,4$
IFN- γ	$79,6 \pm 16,2$ ($P < 0,001$)	$69,3 \pm 6,9$ ($P < 0,001$)	$9,2 \pm 0,5$
ФНО- α	$5,8 \pm 0,7$ ($P < 0,001$)	$6,2 \pm 0,7$ ($P < 0,001$)	$2,6 \pm 0,35$

Концентрация IL-4 в сыворотке крови, определяемая до лечения, повышалась незначительно (до $2,0 \pm 0,5$ пг/л) и не отличалась статистически значимо от показателей практически здоровых лиц ($P < 0,1$). Через 10 дней после проведенного лечения церебролизином, в отличие от реакции других (провоспалительных) цитокинов, уровень IL-4 повысился до $2,8 \pm 0,4$ пг/л и стал в 2,1 раза выше референтной нормы, хотя и не отличался статистически достоверно от исходных значений. Это может быть объяснено иммуномодулирующим влиянием церебролизина на активацию противовоспалительных стимулов в ответ на растущие провоспалительные воздействия [8].

Концентрация IL-6 до лечения отмечалась значительно повышенной (в 7 раз) от уровня здоровых лиц, достигала $21,2 \pm 5,0$ пг/мл ($P < 0,001$), а через 10 дней лечения повысилась по сравнению с исходной до $28,7 \pm 13,6$ пг/л. Такое повышение указывает на более выраженную активацию синтеза IL-6 и, следовательно, более широкое вовлечение его в воспалительный процесс при ЧМТ. IL-6 является цитокином вторичного каскада, синтез которого запускается ФНО- α и IL-1 β . Основными функциями IL-6 является запуск антителообразования В-лимфоцитами и индукция острофазного воспалительного ответа: выработка гепатоцитами печени белков острой фазы воспаления [9].

Значения содержания IFN- γ в первые дни после травмы в сыворотке крови обследованных больных были значительно выше референтной нормы – в 8,6 раза ($79,6 \pm 16,2$) ($P < 0,001$). На 10 сутки после лечения происходило понижение содержания IFN- γ до $69,3 \pm 6,9$, и его значения не отличались статистически достоверно от исходных цифр. IFN- γ имеет свойства как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов, наиболее значимый механизм его действия связан с участием этого цитокина в регуляции Т-клеточного звена иммунитета. Развитие иммунодефицитного состояния при многих патологических состояниях объясняют повышением апоптоза иммунокомпетентных клеток [8]. Вероятно,

обнаруженное нами у больных повышение уровня IFN- γ в периферической крови, индуцирует IFN- γ – как опосредованный механизм апоптоза клеток иммунной системы. При изучении субпопуляций лимфоцитов было обнаружено развитие Т-клеточного иммунодефицита, что, возможно, свидетельствовало об усилении клеточного апоптоза при ЧМТ.

Содержание ФНО- α до лечения увеличилось в 2,2 раза по сравнению с нормой и достигало значений $5,8 \pm 0,7$ пг/мл ($P < 0,01$), и через 10 дней лечения его уровень продолжал повышаться до $6,2 \pm 0,7$ пг/л. Статистически значимого различия между значениями до и после лечения не было выявлено. Вторичный прирост содержания цитокина ФНО- α , как и IL-6, скорее всего, характеризовал формирование качественно нового этапа патогенеза воспалительной реакции – происходила её генерализация.

Таким образом, у пациентов с ЧМТ – ушибом головного мозга средней тяжести, в остром периоде до начала лечения в сыворотке крови отмечалось существенное повышение концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 и 6, IFN- γ и ФНО- α , которое было статистически достоверным при сравнении с группой доноров. Содержание противовоспалительного цитокина IL-4 не отличалось от уровня здоровых добровольцев. Через 10 дней после проведенного лечения церебролизином наблюдался рост противовоспалительного цитокина IL-4 в сыворотке крови, а уровень провоспалительных цитокинов ФНО- α , IL-6, IFN- γ и IL-1 имел тенденцию к снижению.

Согласно литературным данным [2,4], наиболее информативным показателем состояния иммунной системы является Т-звено, так как именно его уровень очень мобилен и быстро реагирует на любую активную стимуляцию иммунного ответа. При исследовании влияния препарата нейропротекторного действия на основные мишени иммунной системы – Т- и В-лимфоциты было выявлено их разнонаправленное действие на исследуемые типы клеток (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЧМТ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРЕБРОЛИЗИНОМ (%)

Показатель	До лечения (n=10)	После лечения (n=10)	Доноры (n=20)
CD3+	$34,3 \pm 1,4$ ($P < 0,001$)	$41,2 \pm 2,7$ ($P < 0,5$)	$40,5 \pm 1,3$
CD4+	$20,4 \pm 1,2$ ($P < 0,001$)	$21,5 \pm 2,2$ ($P < 0,001$)	$32,0 \pm 0,9$
CD8+	$14,1 \pm 0,8$ ($P < 0,002$)	$15,2 \pm 1,6$ ($P < 0,05$)	$11,8 \pm 0,4$
CD16+	$16,4 \pm 1,5$ ($P < 0,001$)	$18,4 \pm 3,2$ ($P < 0,001$)	$5,0 \pm 0,2$
CD20+	$18,9 \pm 0,9$ ($P < 0,05$)	$24,9 \pm 1,8$ ($P < 0,001$)	$16,0 \pm 0,9$
CD95+	$21,5 \pm 1,6$ ($P < 0,001$)	$20,8 \pm 1,6$ ($P < 0,001$)	$8,4 \pm 0,3$
ИРИ	$1,5 \pm 0,25$ ($P < 0,5$)	$1,4 \pm 0,1$ ($P < 0,5$)	$1,5 \pm 0,5$



Содержание Т-лимфоцитов (СД4+) положительных клеток и СД3+ Т-хелперов у больных с ЧМТ до лечения было достоверно снижено и составляло $20,4 \pm 1,2\%$ и $34,3 \pm 1,4\%$, тогда как содержание данных субпопуляций лимфоцитов у здоровых добровольцев составляло $32,0 \pm 0,9\%$ и $40,5 \pm 1,3\%$. После лечения, к 10 суткам отмечается восстановление показателя общего числа Т-лимфоцитов, содержание которого достигло физиологических значений ($41,2 \pm 2,7\%$). Процентное содержание Т-хелперов незначительно повысилось по сравнению с исходными значениями и составило $21,5 \pm 2,2\%$.

Анализируя возможные причины диагностированной иммунодепрессии, можно полагать, что продукты распада повреждённых тканей, дериваты гемоглобина, активация окислительных процессов, манифестация продукции острофазовых белков и воспалительных цитокинов способствуют угнетению пролиферации лимфоцитов, что может стать основой для гнойно-септических осложнений.

Содержание СД8+ Т-лимфоцитов отличалось от предыдущих показателей совершенно иной динамикой. До начала лечения отмечали повышение уровня СД8+ лимфоцитов, который составлял $14,1 \pm 0,8\%$, что было достоверно выше, чем в группе практически здоровых лиц. На 10 сутки отмечалось дальнейшее нарастание концентрации Т-супрессоров от исходных значений до $15,2 \pm 1,6\%$.

Наиболее точно соотношение между лимфоцитами с хелперными и супрессорными свойствами отражает иммунорегуляторный индекс, который был изучен в данной работе. В первые сутки клеточное равновесие не отличалось от контрольных значений ($1,5 \pm 0,25\%$). На 10 сутки лечения церебролизином клеточное равновесие незначительно смещалось в пользу Т-лимфоцитов с супрессорными свойствами ($1,4 \pm 0,1\%$).

Содержание в крови естественных киллерных клеток СД16+ лимфоцитов у больных с ЧМТ до начала лечения достоверно повышалось до $16,4 \pm 1,5\%$, что почти в 3 раза больше по сравнению с контролем (здоровые лица). На 10 день процентное содержание СД16+ НК-лимфоцитов продолжает нарастать до $18,4 \pm 3,2\%$, что почти в 3,7 раза выше физиологической нормы.

Содержание в крови В-лимфоцитов (СД20+) до начала лечения было увеличено незначительно по сравнению с группой контроля ($18,9 \pm 0,9\%$); на 10 день лечения тенденция к нарастанию данного показателя иммунограммы сохранялась. Процентное содержание В-лимфоцитов после лечения повысилось в 1,5 раза по сравнению с физиологической нормой и составило $24,9 \pm 1,8\%$.

Учитывая важное значение процесса апоптоза в поддержании гомеостаза, нами было проанализировано содержание лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор (СД95+), как маркер поздней активации, характеризующий готовность клеток к апоптозу. До начала лечения отмечали повышение уровня СД95+ лимфоцитов, который составлял $21,5 \pm 1,6\%$, что было достоверно выше, чем в группе практически здоровых лиц. На 10 сутки отмечается незначительное снижение концентрации СД95+ клеток от исходных значений до $20,8 \pm 1,6\%$, не достигающей нормальных значений.

При исследовании иммунологических показателей после курса лечения в исследуемой группе обращало на себя внимание увеличение процентного содержания СД3+ и СД4+ субпопуляций Т-лимфоцитов. Процентное содержание общих (СД3+) Т-лимфоцитов увеличилось до 1,2 раза, достигло физиологических значений и достоверно отличалось от исходных значений. Процентное содержание Т-хелперов увеличилось незначительно. СД8, СД16+ и СД20+ субпопуляции лимфоцитов имели тенденцию к вторичному приросту, в целом, достоверно не отличались от исходных значений. Проведённые исследования показали увеличение спонтанного апоптоза иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с ЧМТ в сравнении с группой здоровых лиц. Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы готовности к Fas-зависимому апоптозу после курса лечения снизилось незначительно. ИРИ у пациентов с ЧМТ не отличался от значений здоровых добровольцев.

Таким образом, терапия церебролизином обусловила положительные изменения среди показателей клеточного иммунитета и частичную коррекцию возникшего после ЧМТ Т-клеточного иммунодефицита. Через 10 дней после проведённого лечения церебролизином наблюдался рост противовоспалительного цитокина IL-4, уровень провоспалительных цитокинов ФНО- α , IL-6, а IFN- γ и IL-1 – имел тенденцию к снижению. Анализ динамики Т-клеточного иммунитета на 10 день лечения церебролизином выявил увеличение процентного содержания СД3+ и СД4+ субпопуляций Т-лимфоцитов. Процентное содержание общих (СД3+) Т-лимфоцитов увеличилось до 1,2 раза и достигло физиологических значений, а Т-хелперов – незначительно.

Использование в комплексе лечения больных с ЧМТ церебролизина, обладающего нейропротективным, нейротрофическим и иммуномодулирующим эффектом, позволяет уменьшить проявления иммунодепрессии и, таким образом, снизить частоту гнойно-септических осложнений.



ЛИТЕРАТУРА

1. Кульчиков А.Е. Сравнительное изучение иммунокорректирующего действия нейропептидных препаратов при острой экспериментальной цереброваскулярной патологии / А.Е.Кульчиков [и др.] // Цитокины и воспаление. - 2009. - №3. - С 18-23.
2. Пичугина Л.В. Внутриклеточные цитокины: проблемы детекции и клиническое значение / Л.В. Пичугина, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 2008. - №1. - С. 55-63.
3. Мамытова Э.М. Особенности иммунных нарушений в остром периоде черепно-мозговой травмы / Э.М.Мамытова // Вестник Авиценны. - 2013. - №4. - С.72-76
4. Бакунц Г.О. Функциональная активность естественных киллеров и антителозависимая цитотоксичность лимфоцитов у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения / Г.О.Бакунц, Л.В.Ковальчук, С.Б.Чекнёв [и др.] // Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. - 1998. - №1. - С. 31-34.
5. Alvarez A. Reduced TNFalpha and increased IGF-I levels in the serum of Alzheimer patients treated with the neurotrophic agent / A.Alvarez [et al.] // Int.
6. Eder P. Increased density of glutamate receptor subunit 1 due to cerebrolysin treatment: an immunohistochemical study on aged rats / P.Eder [et al.] // Histochem. J. - 2001. - V.33. - P. 605-612.
7. Gonzalez M.E. Antioxidant systemic effect of short-term cerebrolysin administration / M.E.Gonzalez, L.Francis, O.Castellano // J. Neural Transm. Suppl. - 1998. - 53. - P. 333-341.
8. Grechko A.T. The neurotropic activity of peptide immunomodulators / A.T.Grechko // Eksp. Klin. Farmakol. - 1998. - 61. - P. 14-16.
9. Peptidergic drugs increase the synaptophysin immunoreactivity in brains of 24-month-old rats // Histochem. J. - 1999. - 31. - P. 395-401.

Summary

Immunological disorders and therapy of patients with traumatic brain injury

E.M. Mamytova

Kyrgyz State Medical Academy named after IK Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyzstan

This paper presents the results of a clinical study, which aimed to study the influence of drug «Cerebrolysin» on cytokine profile state and cellular immunity in patients in the early posttraumatic period with moderate-to-severe traumatic brain injury (TBI).

Therapy with cerebrolysin led to positive changes of cellular immunity and partial correction T-cell immunodeficiency that occurs after TBI. After 10 days with cerebrolysin treatment there was an increase anti-inflammatory cytokine IL-4 (before treatment $2,0 \pm 0,5$ pg/L, after – to $2,8 \pm 0,4$ pg/L), which is 2,1 times higher reference standards, the level of pro-inflammatory cytokines TNF- α ($5,8 \pm 0,7$ pg/ml; $6,2 \pm 0,7$ pg/l); IL-6 ($21,2 \pm 5,0\%$; $28,7 \pm 13,6\%$), which is 3.7 times higher than the physiological limits, and IFN- γ and IL-1 – tended to decrease: IFN- γ – by $79,6 \pm 16,2$ to $69,3 \pm 6,9$; IL-1 – $9,1 \pm 2,0$ pg / ml and $7,3 \pm 1,6$ pg / ml.

Analysis of T-cell immunity dynamics on 10 day after cerebrolysin treatment increase the percentage of CD3+ (from $34,3 \pm 1,4\%$ to $41,2 \pm 2,7\%$) and CD4+ (from $20,4 \pm 1,2\%$ up to $21,5 \pm 2,2\%$) subpopulations of T - lymphocytes revealed.

Cerebrolysin using in complex treatment of patients with TBI having neuroprotective, neurotrophic and immunomodulatory effects, can reduce the immunosuppression and thus reduce the incidence of septic complications.

Key words: brain injury, cytokines, lymphocyte subpopulations, cerebrolysin, immunity

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Мамытова Эльмира Миталиповна – доцент кафедры нервных болезней с курсом медицинской генетики КГМА им. И.К. Ахунбаева; Кыргызстан, г.Бишкек, ул.Ахунбаева, 92
E-mail: elmiramamytova@yahoo.com