

ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИНАМИКИ ТЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

© 2018 г. Л. М. Азнабаева¹, О. О. Жеребятъева¹, Е. А. Михайлова¹,
С. Б. Киргизова¹, Г. О. Махалова¹, М. В. Фомина¹, Н. Н. Елагина¹,
Т. О. Федорова¹, А. Ю. Миронов²

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, Россия;

²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека, Москва, Россия

Поступила: 04.05.2018. Принята: 08.06.2018

В работе проведена оценка с использованием ИФА уровня цитокинов сыворотки крови и биологических жидкостей лиц, перенесших гнойно-воспалительные заболевания урогенитального тракта. Объектом исследования стал цитокиновый профиль 58 мужчин с гонококковой инфекцией и 40 пациентов с неспецифическим уретритом. Как показало исследование, установленные значения уровней цитокинов были использованы в качестве маркеров объема урогенитального воспаления, что послужило основанием для разработки способа диагностики и прогнозирования течения инфекционного процесса. Выявленные отличия иммуноцитокинового профиля могут способствовать раскрытию механизмов формирования различных форм инфекции, а также определять методологические и тактические подходы к терапии и реабилитации пациентов с нарушением сексуального и репродуктивного здоровья.

Ключевые слова: цитокины, гнойно-воспалительные заболевания урогенитального тракта, ИФА

DOI: 10.31857/S102872210002380-3

Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. М. Горького, 45, ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Азнабаева Лилия Мидехатевна.
Тел.: +89128474336, E-mail: lkhus@yandex.ru

Авторы:

Азнабаева Л. М., к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Жеребятъева О. О., к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Михайлова Е. А., д. б. н., заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Киргизова С. Б., к. б. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Махалова Г. О., ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России Оренбург, Россия;

Фомина М. В., к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Елагина Н. Н., к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Федорова Т. О., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Миронов А. Ю., д. м. н., ведущий сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского», Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Имуноферментный анализ, сокращённо ИФА — лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску.

За почти полувековую историю использования иммуноферментный метод претерпел значительные изменения. Впервые твердофазный (гетерогенный) иммуноферментный анализ провели в 1971 году E. Engvall и P. Perlmann для детекции IgG, а K. Van Weemen и A. Schuurs в этом же году использовали ИФА для определения концентрации эстрогенов [1]. Насчитывается несколько десятков модификаций метода. Огромное разнообразие объектов исследования — от низкомолекулярных соединений, гормонов, фармакологических препаратов, до микроорганизмов — определяет большое количество вариантов этого метода. Причем различными могут быть как объекты детекции, так и варианты регистрации ферментативной активности. Неизменным остается только основа проведения любого варианта ИФА — определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями [2].

В настоящее время ИФА в различных его модификациях используется для массовой диагностики инфекционных заболеваний (выявления различных специфических антигенов или антител к ним); выявления и определения уровня гормонов и лекарственных препаратов в биологических образцах; определения изотипов антител против конкретного антигена; выявления иммунных комплексов; выявления онкомаркеров; определения белков сыворотки крови (ферритин, фибронектин и др.); скрининга моноклональных антител; определения цитокинов в различных биологических жидкостях [3]. Несомненным достоинством метода является его высокая чувствительность, которая обеспечивает детекцию даже низких концентраций белков с молекулярной массой от 10 кДа [4].

Именно к таким белкам относятся цитокины — огромная и гетерогенная группа медиаторов белковой природы с молекулярными массами от 8 до 80 кДа. Основные группы цитокинов: интерфероны, интерлейкины, фактор некроза опухолей, колониестимулирующие факторы, Ростовые факторы. В зависимости от типа клеток, продуцирующих цитокины, их делят на монокины (ИЛ-1, ФНО), синтезируемые моноцитами, макрофагами, и лимфокины (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и др.), синтезируемые лимфоцитами [5]. Известно, что цитокинам принадлежит важная роль в генезе развития воспалительной реакции при гнойно-воспалительных заболеваниях [7]. Основным медиатором воспалитель-

ных реакций является ИЛ-1 β . Вместе с антигеном ИЛ-1 β запускает иммунные процессы, индуцирует активацию и адгезию нейтрофилов, а ИЛ-8, являясь самым сильным хемоаттрактантом, определяет направленность движения нейтрофилов [6]. Прогресс в понимании роли некоторых цитокинов в норме и при патологии был достигнут благодаря развитию методов количественного определения уровней продукции цитокинов. Наиболее оптимальными для оценки уровней цитокинов являются иммуноферментные методы, которые высокоспецифичны, просты и быстры в исполнении [2]. Применение диагностических иммуноферментных тест-систем для оценки цитокинового статуса, как на местном, так и на системном уровнях при различных патологиях является существенным дополнением к пониманию патогенеза заболеваний [3].

Цель исследования — с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) оценить уровень цитокинов ИЛ-1, ИЛ-10 и IFN- γ в биологических жидкостях лиц, перенесших гнойно-воспалительные заболевания уrogenитального тракта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были оценены показатели местного иммунитета и цитокиновый профиль у 98 мужчин двух возрастных групп: 18–40 лет и 41–60 лет. Обследуемые были разделены на группы согласно возрасту и диагнозу. В исследование не включались пациенты с тяжелыми соматическими патологиями. Первая группа обследуемых — 15 мужчин в возрасте от 18 до 40 лет с клинически подтвержденным диагнозом «гонokokковая инфекция». Вторая группа обследуемых — 15 мужчин в возрасте 41–60 лет также с клинически подтвержденным диагнозом «гонokokковая инфекция». Клинический диагноз, был установлен в соответствии с приказом МЗ РФ № 415 от 2003 г. Третью группу обследуемых составили 22 пациента с неспецифическим уретритом (НУ) в возрасте 18–40 лет. Четвертая группа 18 пациентов в возрасте 41–60 лет с неспецифическим уретритом. Группы сравнения (группы 5 и 6) составили по 14 здоровых мужчин соответствующих возрастов.

В исследуемом материале — эякуляте, полученном путем мастурбации после трехдневного воздержания от половой жизни, определяли уровень интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-10 (ИЛ-10) и гамма-интерферона (IFN- γ).

В работе использованы набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» № РЗН 2017/6008; набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-1 бета в сыворотке крови и моче «Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ» № РЗН 2017/6010; набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-10 в сыворотке крови «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ» № РЗН 2017/6011. Регистрация результатов осуществлялась на фотометре Multiskan NfS (Labsystems, Финляндия).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Microsoft Excel 2010 и Biostat 2009 и включала вычисление средних значений параметров, стандартных ошибок среднего, квантилей (в т.ч. медиан) в разных группах, определение нормальности и вычисление коэффициентов Манна-Уитни [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Здоровые мужчины имели содержание IFN- γ в среднем на уровне $7,2 \pm 0,4$ пг/мл в 5-й группе и $7,9 \pm 0,4$ пг/мл — в 6-й группе. При гонорее отмечены низкие значения данного показателя, причем у пациентов старшей возрастной категории концентрация IFN- γ составляла $2,4 \pm 0,3$ пг/мл, что в три раза ниже показателей IFN- γ у здоровых мужчин. При наличии неспецифического воспаления (у пациентов 4-й обследуемой группы) также отмечены низкие значения IFN- γ ($5,9 \pm 0,7$ пг/мл). Низкие значения одного из противовоспалительных цитокинов может подтверждать длительное вялотекущее воспаление [9]. У молодых пациентов с неспецифическим уретритом наблюдались высокие значения IFN- γ — $10,4 \pm 0,4$ пг/мл.

Концентрация провоспалительного цитокина — интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) у здоровых молодых мужчин составляла $20,1 \pm 2,8$ пг/мл, тогда как у зрелых мужчин 41–60 лет концентрация ИЛ-1 β была в 1,7 раз ниже ($11,8 \pm 2,1$ пг/л. При наличии воспалительного процесса как специфической (гонококковой), так и при неспецифической природы уровень ИЛ-1 β у пациентов выше нормальных показателей. Высокий уровень ИЛ-1 β может являться индикатором наличия бактериальных продуктов (липополисахарида, мурамилдипептида, белка А бактерий) [6]. Наибольшие значения концентрации ИЛ-1 β выявлены у мужчин 1-й группы (с го-

нококковой инфекцией) — $57 \pm 7,0$ пг/мл, в 3-й группе также отмечен высокий уровень ИЛ-1 β , который был равен $9,0$ пг/мл. Обследованные 41–60 лет имели хотя и высокие показатели ИЛ-1 β , но они были достоверно ниже, чем у лиц молодого возраста. Так, материал пациентов 2-й группы содержал этот цитокин в средней концентрации $36,8 \pm 7,0$ пг/мл, а 4-й всего лишь — $18,4 \pm 5,0$ пг/мл.

Противовоспалительный интерлейкин-10 (ИЛ-10) у пациентов с уретритом гонококковой этиологии синтезировался в концентрации $51,7 \pm 9,9$ пг/мл, тогда как у здоровых мужчин этот показатель был в два раза выше и составлял $102 \pm 27,9$ пг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установленные значения уровней цитокинов были использованы в качестве маркеров объема урогенитального воспаления, что послужило основанием для разработки способа диагностики и прогнозирования течения инфекционного процесса [10]. Выявленные отличия иммуноцитокينوвого профиля могут способствовать раскрытию механизмов формирования различных форм инфекции, а также определять методологические и тактические подходы к терапии и реабилитации пациентов с нарушением сексуального и репродуктивного здоровья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Gan S. D., Patel K. R.* Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Invest Dermatol*, 2013, 9, Vol. 133 (9), 12.
2. *Белая О. Ф., Пак С. Г.* Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. *Вестник РАМН*, 2010, 11, 50–53. [*Belaya O. F., Pak S. G.* Ways of improving laboratory diagnosis of infectious diseases. *Vestnik RAMN*, 2010, 11, 50–53].
3. *Долгов В. В., Ракова Н. Г., Колупаев В. Е., Рытикова Н. С.* Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях. М.—Тверь: Триада. 2007. 320 с. [*Dolgov V. V., Rakova N. G., Kolupaev V. E., Rytikova N. S.* Immunosorbent assay in clinical diagnostic laboratories. Moscow-Tver: Triada, 2007. 320 p].
4. *Самойленков П. В.* Принципы иммуноферментного анализа, основные виды ИФА, применение в диагностике. Москва, 2009, РГМУ. [*Samoylenkov P. V.* Immunoassay principles, the main types of ELISA application in diagnostics. Moscow, 2009, RGMU].
5. *Baggiolini M., Dewald B., Moser B.* Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, Vol. 15, 675–705.

6. *Dinarelo C.* The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.*, 1994, Vol. 5, 517–526.
7. *Курьнин Р. М.* Достижения отчетственной молекулярной генетики для клинической онкоурологии. *Урология сегодня*, 2009, 4, 17. [*Kuryinin R. M.* Achievements national molecular genetics to clinical oncology. *Urologiya segodnya*, 2009, no. 4, p. 17 (in Russ.)].
8. *Герасимов А. Н.* Медицинская статистика. М. МИА. 2007. [*Gerasimov A. N.* Medical statistics. М. МИА. 2007].
9. *Демьянов А. В., Котов А. Ю., Симбирцев А. С.* Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике. *Цитокины и воспаление*, 2003, Т. 2, 3, 20–35. [*Demyanov A. V., Kotov A. Yu., Simbirtsev A. S.* Diagnostic value of cytokine levels research in clinical practice. *Cytokines and inflammation*, 2003, Vol. 2, 3, 20–35].
10. *Жеребятьева О. О., Сетко Н. П., Михайлова Е. А., Киргизова С. Б., Константинова О. Д., Кшнясева С. К., Махалова Г. О., Ляшенко И. Э.* Иммунологические критерии прогнозирования вторичного бесплодия. *Российский иммунологический журнал* 2015, 9(18), 2 (1), 378–379. [*Zherebyatyeva O. O., Setko N. P., Mikhailova E. A., Kirgizova S. B., Konstantinova O. D., Kshnyaseva S. K., Mahalova G. O., Lyashenko I. E.* Immunological criteria for forecasting the secondary sterility. *Russian Immunological Journal* 2015, 9 (18), 2 (1), 378–379. Russian].

ELISA DETECTION OF CYTOKINE LEVELS TO DETERMINE THE DYNAMICS OF THE FLOW INFLAMMATORY PROCESS

© 2018 L. M. Aznabaeva¹, O. O. Zherebyatyeva¹, E. A. Mikhailova¹, S. B. Kirgizova¹, G. O. Mochalova¹, M. V. Fomina¹, N. N. Elagina¹, T. O. Fedorova¹, A. Yu. Mironov²

¹*Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;*

²*The G. N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor of Russia, Moscow, Russia*

Received: 04.05.2018 **Accepted:** 08.06.2018

The work carried out an assessment using ELISA level of serum cytokines and biological fluids of persons who have undergone purulent-inflammatory diseases of the urogenital tract. The object of the study was the cytokine profile of 98 men with gonococcal infection and 40 patients with nonspecific urethritis. The study showed that the established values of cytokine levels were used as markers of the volume of urogenital inflammation, which served as the basis for the development of a method of diagnosis and prediction of the course of the infectious process. The revealed differences in the immunocytocin profile can contribute to the disclosure of the mechanisms of formation of various forms of infection, as well as to determine the methodological and tactical approaches to the treatment and rehabilitation of patients with sexual and reproductive health disorders.

Key words: cytokines, purulent-inflammatory diseases of the urogenital tract, ELISA

Authors:

Aznabaeva L. M., ✉ MD, PhD, associate Professor in the Department of Microbiology, Virology, Immunology, of Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

460000, Orenburg, M. Gorky str., 45, Orenburg State Medical University. Phone: +89128474336, **E-mail:** lkhus@yandex.ru;

Zherebyatyeva O. O., MD, PhD, associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology of Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

Mikhailova E. A., Dr. rer. nat., Professor, head of Department of Microbiology, Virology, Immunology, Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

Kirgizova S. B., Dr. rer. nat., associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology of Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

Machalova G. O., assistant Professor, Department of obstetrics and gynecology of Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

Fomina M. V., MD, PhD, associate Professor in the Department of Microbiology, Virology, Immunology, of Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

Yelagina N. N., MD, PhD, associate Professor in the Department of Microbiology, Virology, Immunology, of Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

Fedorova T. O., assistant of Department of Microbiology, Virology, immunology of Orenburg State Medical University (OrSMU), Orenburg, Russia;

Mironov A. Y., MD, Ph.D., Leading Researcher The G. N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor of Russia, Moscow, Russia.