

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Третьякова Ю.И.¹, Антипова А.А.¹, Шулькина С.Г.¹

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, e-mail: psmalf@ru

Цель исследования: оценить уровень про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у больных язвенным колитом (ЯК). Изучить взаимосвязи данных показателей с тяжестью атаки заболевания. Обследовано 100 пациентов (57 мужчин и 43 женщины) с ЯК в фазе обострения, средний возраст которых составил 34,34±11,47 года. 50 практически здоровых лиц составили группу сравнения. В сыворотке крови определяли концентрацию цитокинов: фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-4 (IL-4), моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1). В качестве маркера повреждения эндотелия исследовали уровень васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) в сыворотке крови. Определяли индекс клинической (ИКА) и эндоскопической активности (ИЭА) по В. Rachmilewits (1989). У больных ЯК выявлена гиперпродукция как про-, так и противовоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, MCP-1 и IL-4. Медиана концентрации VEGF в сыворотке крови пациентов с ЯК составила 256,65 (123,30-375,80) пг/мл и была в 3 раза выше уровня данного показателя у здоровых лиц (85,0 (4,20-187,40) пг/мл; $p=0,0003$). Выявлены достоверные прямые взаимосвязи концентрации цитокинов между собой. Также была выявлена прямая значимая взаимосвязь между уровнем VEGF и концентрацией цитокинов ($p<0,05$). Все медиаторы воспаления значимо коррелировали с тяжестью атаки ЯК, ИКА, ИЭА и локализацией процесса в толстой кишке. Ассоциация нарушений цитокинового профиля с маркерами дисфункции эндотелия и степенью тяжести атаки ЯК подтверждает тесную взаимосвязь процессов воспаления и ангиогенеза. Определение уровня цитокинов TNF- α , IL-6, MCP-1 и IL-4 и васкулоэндотелиального фактора роста VEGF в сыворотке крови может быть использовано в качестве неинвазивных методов оценки степени тяжести воспалительного процесса в стенке толстой кишки у больных ЯК.

Ключевые слова: язвенный колит; фактор некроза опухоли-альфа; интерлейкин-6; интерлейкин-4; моноцитарный хемоаттрактантный протеин -1; васкулоэндотелиальный фактор роста; эндотелиальная дисфункция.

PECULIARITIES OF THE CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

Tretyakova Yu.I.¹, Antipova A.A.¹, Shulkina S.G.¹

¹FSBEI HE Perm State Medical University named after academician E. Wagner, Health Ministry of Russia, Perm, psmalf@ru

Objective: to assess the level of pro-and anti-inflammatory cytokines in serum in patients with ulcerative colitis (UC). To study the relationship between these indicators and the severity of the disease attack. 100 patients (57 men and 43 women) with UC in the acute phase and 50 practically healthy individuals were examined. The average age of patients was 34.34 \pm 11.47 years. The concentration of cytokines: tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-4 (IL-4), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was determined in the blood serum. As a marker of endothelial damage, the level of vasoendothelial growth factor (VEGF) in serum was examined. The Rakhmilevich's indexes of clinical (CAI) and endoscopic activity (EAI) were determined. In patients with UC hyperproduction of both pro- and anti-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, MCP-1 and IL-4 was detected. The VEGF median concentration in the serum of UC patients was 256.65 (123.30-375.80) pg/ml and was 3 times higher than in healthy individuals (85.0 (4.20-187.40) pg / ml, $p = 0.0003$). Reliable direct interrelations of the concentration of cytokines with each other have been revealed. A direct significant relationship between the level of VEGF and the concentration of cytokines ($p < 0.05$) was also revealed. All mediators of inflammation significantly correlated with the severity of attack of UC, CAI, EAI and localization of the process in the large intestine. The association of cytokine profile disorders with markers of endothelial dysfunction and the severity of UC attack confirms the close interrelation of the processes of inflammation and angiogenesis. The determination of the level of cytokines TNF- α , IL-6, MCP-1 and IL-4 and vasoendothelial growth factor VEGF in serum can be used as non-invasive methods for assessing the severity of the inflammatory process in the colon wall in UC patients.

Keywords: ulcerative colitis; tumor necrosis factor-alpha; interleukin-6; interleukin-4; monocyte chemoattractant protein -1; vasoendothelial growth factor; endothelial dysfunction.

Язвенный колит (ЯК) занимает одну из лидирующих позиций среди болезней желудочно-кишечного тракта и продолжает оставаться серьезной проблемой гастроэнтерологии. Увеличение частоты заболеваемости ЯК, длительность и торпидность течения с периодически тяжелыми атаками, поражение лиц молодого возраста обуславливают важность углубленного изучения данной патологии [1].

Согласно зарубежным данным, заболеваемость ЯК составляет от 0,6 до 24,3, а распространенность достигает 505 на 100 000 человек [2]. Данные о распространенности ЯК в России ограничены [3].

Исследования, проведенные в последние годы, убедительно доказали, что существенную роль в развитии ЯК играют цитокины, хемокины и факторы роста ангиогенеза, являющиеся медиаторами иммуновоспалительных реакций. При ЯК прослеживается дисбаланс между противовоспалительными и провоспалительными цитокинами в сторону повышения концентрации последних в крови и тканях [4]. Цитокины – низкомолекулярные вещества белковой природы, регулирующие разнообразные аспекты межклеточных взаимодействий. Провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли-альфа (tumor necrosis factor- α , TNF- α) и интерлейкин-6 (interleukin-6, IL-6) являются наиболее активными цитокинами и играют ключевую роль в процессе воспаления. TNF- α стимулирует выработку IL-6, поэтому функции и биологические эффекты IL-6 совпадают с функциями его активатора. Оба цитокина опосредуют воспалительные реакции: симптомы эндотоксемии, лихорадку, лейкоцитоз и индукцию острофазных белков [5].

Одним из цитокинов с противовоспалительной активностью является интерлейкин-4 (interleukin-4, IL-4). Иммунорегуляторная и противовоспалительная активность IL-4 является общепризнанной, однако его роль в развитии воспалительных заболеваний кишечника изучена недостаточно. Научными исследованиями последних лет показано, что развитие ряда заболеваний кишечника связано с эндотелиальной дисфункцией (ЭД). Сосудистый эндотелий является высокоспецифичным метаболическим активным монослоем клеток, выстилающим все сосуды организма [6]. На фоне поражения эндотелия усиливается выработка васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF), который способствует развитию новых кровеносных сосудов (ангиогенез), выживанию незрелых кровеносных сосудов и является маркером ЭД и показателем активности регенераторного компонента воспалительной реакции [7].

Синтез моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), являющегося хемокином, индуцируется TNF- α , IL-6, 4 и т.д. Под воздействием данного хемокина происходит также пролиферация гладкомышечных клеток

сосудов, что приводит к сосудистому повреждению и прогрессии заболевания. Показано, что инкубация различных эндотелиальных клеток в присутствии VEGF вызывает в них усиление продукции MCP-1 [8]. На сегодняшний день существует ряд работ, посвящённых изучению роли ангиогенеза в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний кишечника, в частности ЯК [9]. Показано, что высокие сывороточные концентрации VEGF коррелируют с активностью заболевания, наличием системных проявлений и осложнений ЯК, а также с поздним ответом на консервативную терапию [10].

Однако у специалистов пока нет единого мнения о характере и степени изменений цитокинового профиля, а также о взаимосвязи процессов ангиогенеза и воспаления у больных ЯК и их влиянии на тяжесть и прогрессирование воспаления в кишечнике.

В связи с изложенными выше фактами дальнейшее изучение цитокинов, хемокинов и факторов роста при данной нозологии необходимо для уточнения механизмов патогенеза, определения прогностических критериев ответа на терапию и ее совершенствования.

Цель исследования – оценить уровень про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у пациентов с ЯК. Изучить взаимосвязи данных показателей с тяжестью воспалительного процесса в толстой кишке.

Материал и методы исследования. Обследовано 100 пациентов с ЯК в фазе активного воспаления. Средний возраст составил $34,34 \pm 11,47$ года, 57 мужчин и 43 женщины. Пациенты обследованы на базе отделений гастроэнтерологии и хирургии ГБУЗ «КМСЧ № 1», ГКБ № 2 (г. Пермь). Диагноз ЯК устанавливали на основании клинических рекомендаций по диагностике и лечению пациентов с ЯК [3]. Для определения тяжести атаки ЯК использовали критерии Truelove, Witts, переработанные Левитаном М.Х.; индексы клинической и эндоскопической активности (ИКА и ИЭА) по В. Rachmilewits (1989).

При оценке тяжести атаки у больных ЯК выявлено следующее распределение: легкая атака – была отмечена у 27 человек (27%), средняя – у 34 (34%) и тяжелая - у 39 человек (39%).

В соответствии с локализацией патологического процесса проктит диагностирован у 26 пациентов (26%), левосторонний колит – у 31 пациента (31%), и тотальное поражение – у 43 больных (43%).

Также были обследованы 50 практически здоровых лиц, аналогичных по полу и возрасту.

Концентрацию TNF- α , IL-6, IL-4, MCP-1 и VEGF в венозной крови определяли методом иммуноферментного анализа с применением одноименных наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) и планшетного фотометра Star-Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США).

Статистическую обработку результатов осуществляли с применением программных пакетов Statistica 6.1 и использованием методов вариационной статистики и непараметрических критериев. Для описания полученных количественных признаков данные представляли в виде медианы (Me) и 25 и 75 перцентиля. Для оценки значимости различий независимых групп применяли критерий Манна-Уитни. Количественную оценку линейной зависимости между двумя случайными величинами определяли с использованием коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (RS). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного исследования было выявлено значимое повышение концентрации провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 в сыворотке крови у пациентов с ЯК по сравнению с практически здоровыми лицами (3,38 (0,85-4,90) и 2,05 (0,00-5,40) пг/мл; $p=0,02$ и 0,0001 соответственно) (табл. 1). Содержание IL-4 составило 1,90 (1,60-2,50) пг/мл, что было в 1,4 раза выше, чем в контрольной группе ($p=0,04$). Уровень MCP-1 был повышен в 1,2 раза у пациентов с ЯК по сравнению со здоровыми лицами (188,90 (123,70-283,10) и 168,25 (133,20-184,70) соответственно; $p=0,04$) (табл. 1). Гиперпродукция как про-, так и противовоспалительных цитокинов у пациентов с ЯК свидетельствует о нарушении иммунорегуляции и контроля над процессами воспаления.

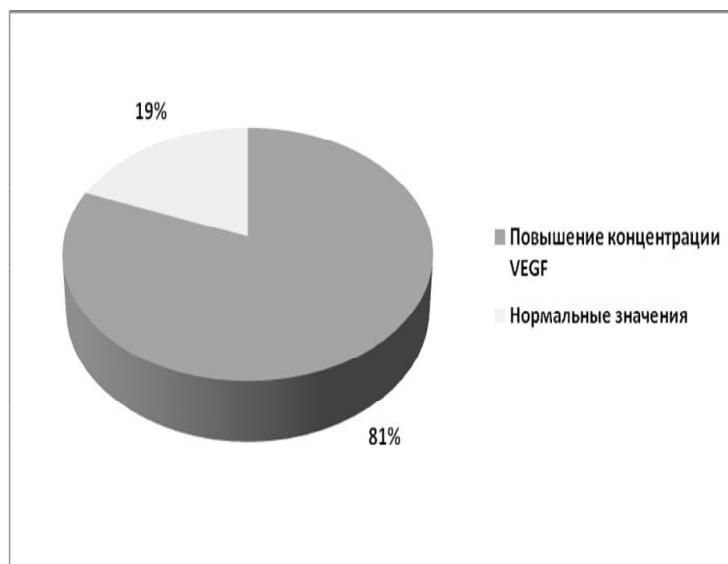
Таблица 1

Концентрация цитокинов и васкулоэндотелиального фактора роста в сыворотке крови больных язвенным колитом и практически здоровых лиц, медиана (25; 75 перцентиль)

Показатель	Больные ЯК (n=100)	Контрольная группа (n=50)	p
TNF- α , пг/мл	3,38 (0,85-4,90)	0,00 (0,00-0,00)	0,02
IL-6, пг/мл	2,05 (0,00-5,40)	0,00 (0,00-0,00)	0,0001
IL-4, пг/мл	1,90 (1,60-2,50)	1,40 (1,00-1,40)	0,04
MCP-1, пг/мл	188,90 (123,70-283,10)	168,25 (133,20-184,70)	0,04
VEGF, пг/мл	256,65 (123,30-375,80)	85,0 (4,20-187,40)	0,0003

p – достоверность различий между группами, критерий Манна-Уитни.

У больных ЯК было отмечено значимое увеличение фактора роста VEGF, концентрация которого составила 256,65 (123,30-375,80) пг/мл и в 3 раза превышала уровень данного показателя в контрольной группе ($p=0,0003$) (табл. 1). У 81% (81 чел.) больных был повышен средний показатель данного фактора по сравнению с референсными значениями (рисунок).



Структура концентрации VEGF у больных ЯК

Стимуляция продукции васкулоэндотелиального фактора роста, по-видимому, обусловлена повреждением эндотелия кишечника с развитием микроциркуляторных нарушений в виде ишемии, ведущей к усилению процессов ангиогенеза.

При сравнительном анализе уровней цитокинов в зависимости от тяжести атаки ЯК наиболее высокие значения были получены при тяжелых формах заболевания. При обострении ЯК легкой и средней степени тяжести концентрация данных показателей была значимо ниже (табл. 2). Так, уровень TNF- α при тяжелой атаке ЯК составил 8,70 (7,10-12,00) пг/мл, тогда как при атаке легкой и средней степени тяжести уровень данного показателя был достоверно ниже (табл. 2). Содержание IL-6 было максимальным при тяжелом обострении (11,00 (7,10-17,00)), в отличие от обострения средней и легкой тяжести (2,05 (1,40-3,25) и 0,40 (0,00-0,80) соответственно; $p < 0,05$). Также были отмечены значимо более высокие уровни IL-4 и MCP-1 при тяжелом течении ЯК (2,65 (2,00-3,00) и 456,00 (293,50-657,10) соответственно; $p < 0,05$).

Уровень VEGF в сыворотке крови также нарастал по мере увеличения тяжести атаки ЯК и при тяжелой форме составил 622,80 (526,80-717,90) пг/мл. При обострении ЯК легкой степени уровень фактора роста сосудов был значимо ниже ($p=0,0000$) (табл. 2).

Таблица 2

Уровень цитокинов в сыворотке крови в зависимости от тяжести атаки ЯК,
медиана (25; 75 перцентиль)

Показатели	Тяжесть атаки ЯК			p
	Легкая	Средняя	Тяжелая	
TNF- α , пг/мл	0,20 (0,00-0,50)	2,55 (1,20-5,10)	8,70 (7,10-12,00)	$p^{1-2}=0,0000$ $p^{2-3}=0,00003$ $p^{1-3}=0,0000$

IL-6, пг/мл	0,40 (0,00-0,80)	2,05 (1,40-3,25)	11,00 (7,10-17,00)	$p^{1-2}=0,02$ $p^{2-3}=0,0003$ $p^{1-3}=0,00004$
IL-4, пг/мл	1,20 (1,00-1,40)	1,80 (1,60-1,90)	2,65 (2,00-3,00)	$p^{1,2,3}=0,0000$
MCP-1, пг/мл	113,85 (84,00-127,50)	193,40 (178,00-205,80)	456,00 (293,50-657,10)	$p^{1,2,3}=0,0000$
VEGF, пг/мл	96,75 (57,00-150,00)	230,30 (200,0-306,80)	622,80 (526,80-717,90)	$p^{1,2,3}=0,0000$

Примечание: p - статистически значимые результаты.

При корреляционном анализе выявлены значимые прямые взаимосвязи концентрации про- и противовоспалительных цитокинов между собой, а также с тяжестью патологических изменений в кишечнике (табл. 3). Наиболее высокие корреляционные связи были отмечены между TNF- α и IL-6 ($r=0,6$, $p=0,0000$) и TNF- α и степенью тяжести ЯК ($r=0,7$; $p=0,000$). Полученные результаты подтверждают тот факт, что данные провоспалительные цитокины являются наиболее активными и играют ключевую роль в процессе иммунного воспаления при ЯК.

Также была выявлена прямая взаимосвязь между уровнем VEGF и концентрацией цитокинов ($r=0,34$; $0,3$; $0,53$; $0,3$ для TNF- α ; IL-6, IL-4, MCP-1 соответственно), степенью тяжести атаки ЯК, индексом клинической и эндоскопической активности и локализацией эрозивно-язвенного процесса в кишечнике ($r=0,39$; $0,37$; $0,45$; $0,4$) (табл. 3).

Таблица 3

Корреляционные взаимосвязи цитокинов и VEGF со степенью тяжести атаки ЯК, ИКА, ИЭА и локализацией процесса в толстой кишке

Показатели	RS	P
TNF- α и IL-6	0,6	0,0000
IL-6 и IL-4 ¹ , MCP-1 ²	0,41 ¹ ; 0,3 ²	0,0002 ¹ ; 0,04 ²
VEGF и TNF- α ¹ ; IL-6 ² , IL-4 ³ , MCP-1 ⁴	0,34 ¹ ; 0,3 ² ; 0,53 ³ ; 0,3 ⁴	0,04 ¹ ; 0,02 ² ; 0,04 ³ ; 0,02 ⁴
TNF- α и степень тяжести ЯК ¹ , индекс клинической активности ² , индекс эндоскопической активности ³ , локализация процесса* ⁴	0,7 ¹ ; 0,4 ² ; 0,31 ³ ; 0,3 ⁴	0,000 ¹ ; 0,04 ² ; 0,01 ³ ; 0,04 ⁴
IL-6 и степень тяжести атаки ЯК ¹ , индекс клинической активности ² , индекс эндоскопической активности ³ , локализация процесса* ⁴	0,3 ¹ ; 0,32 ² ; 0,45 ³ ; 0,3 ⁴	0,04 ¹ ; 0,04 ² ; 0,01 ³ ; 0,04 ⁴
IL-4 и степень тяжести атаки ЯК ¹ , индекс клинической активности ² , индекс эндоскопической активности ³ , локализация процесса* ⁴	0,4 ¹ ; 0,31 ² ; 0,3 ³ ; 0,32 ⁴	0,04 ¹ ; 0,04 ² ; 0,01 ³ ; 0,04 ⁴
VEGF и степень тяжести атаки ЯК ¹ , индекс клинической активности ² , индекс эндоскопической активности ³ , локализация процесса* ⁴	0,39 ¹ ; 0,37 ² ; 0,45 ³ ; 0,4 ⁴	0,0003 ¹ ; 0,006 ² ; 0,002 ³ ; 0,04 ⁴

Примечание: RS – коэффициент корреляции Спирмена; P – достоверность корреляции связей; *проктит,

левосторонний колит (включая проктосигмоидит), тотальный колит.

Таким образом, чем больше распространенность поражения и тяжелее течение ЯК, тем выше уровень цитокинов и более выражена эндотелиальная дисфункция.

В результате исследования показано, что у больных ЯК выявлены нарушения функции иммунной системы в виде повышения продукции провоспалительных цитокинов: TNF- α , IL-6, MCP-1 и противовоспалительного IL-4. Это способствует поддержанию и прогрессированию воспалительного процесса в стенке толстой кишки и приводит к ее деструкции. Повышение уровня VEGF в сыворотке крови приводит к микроциркуляторным нарушениям с усугублением ишемии и повреждению эндотелиальной выстилки сосудов кишечника. Ассоциация нарушений цитокинового профиля с маркерами дисфункции эндотелия и степенью тяжести ЯК подтверждает тесную взаимосвязь процессов воспаления и ангиогенеза. В связи с изложенными выше фактами представляется необходимым дальнейшее изучение цитокинов, хемокинов и факторов роста при язвенном колите для определения прогностических критериев ответа на терапию и ее совершенствования.

Выводы

1. У больных язвенным колитом выявлено значимое повышение концентрации в сыворотке крови как про-, так и противовоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, MCP-1 и IL-4, а также повышение васкулоэндотелиального фактора роста VEGF, являющегося маркером повреждения эндотелия сосудов.
2. У пациентов с тяжелой атакой заболевания выявлены достоверно более высокие уровни всех исследуемых цитокинов. При обострении ЯК легкой и средней степени тяжести концентрация данных показателей была значимо ниже.
3. Выявлена значимая взаимосвязь цитокинов между собой, а также с тяжестью атаки язвенного колита, индексом клинической и эндоскопической активности и распространенностью патологического процесса в стенке толстой кишки. Наиболее высокие корреляционные связи были отмечены между TNF- α и IL-6 и TNF- α и степенью тяжести ЯК.
4. Наличие достоверных взаимосвязей уровней цитокинов и васкулоэндотелиального фактора роста и их влияния на тяжесть атаки у больных язвенным колитом подтверждает патогенетическую роль ангиогенеза в развитии и прогрессировании иммуновоспалительного процесса в кишечнике при данной нозологии.
5. Полученные данные позволяют использовать определение уровня цитокинов TNF- α , IL-6, MCP-1 и IL-4 и васкулоэндотелиального фактора роста VEGF в сыворотке крови в качестве доступных, нетравматичных методов оценки степени тяжести воспалительно-деструктивного процесса у пациентов с язвенным колитом.

Список литературы

1. Рахимова О.Ю., Пайзуллаева З.К., Александров В.Б. Нейроэндокринные изменения при воспалительных заболеваниях и раке толстой кишки // Клиническая медицина. - 2010. - № 4. – С. 56–60.
2. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 140. - № 6. – P. 1785–94.
3. Ивашкин В.Т., Шелыгин Ю.А., Халиф И.Л. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита. - 2017. – 31 с.
4. Неспецифические воспалительные заболевания кишечника / под ред. Г.И. Воробьева, И.Л. Халифа. - М.: Миклош, 2008. - 400 с.
5. Emmrigh J. Monoclonal antibodies and interleukins // Falk Sympos. (Innovative concepts in inflammatory bowel disease). – 2002. - № 105. – P. 74.
6. Бойко Т.И., Стойкевич М.В., Колбасина Е.В. Состояние функции сосудистого эндотелия у больных с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника // Сучасна гастроентерология. - 2010. – Т. 51. - № 1. – С. 5-10.
7. Шевченко А.В., Коненков В.И. Функциональный полиморфизм генов семейства VEGF // Цитокины и воспаление. – 2012. - Т. 11. - № 4. – С. 14–20.
8. Никитина В.В., Захарова Н.Б. Значение MCP-1 как предиктора сосудистых нарушений // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2010. – Т. 6. - № 4. – С. 786-790.
9. Kopanakis N., Saiti A., D'Avgerinos E. et al. Serum VEGF and bFGF in patients with inflammatory bowel diseases // Ann. Ital. Chir. – 2014. – Vol. 85. - № 3. – P. 203–206.
10. Стёпина Е.А., Хлынова О.В., Туев А.В. Диагностическая и прогностическая значимость маркеров эндотелиальной дисфункции у пациентов с язвенным колитом // Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97. - № 2. - С. 187-191.