



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ЦИТОКИНСКИ ПРОФИЛ ИМУНСКОГ ОДГОВОРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ТЕШКОМ КЛИНИЧКОМ СЛИКОМ ПАНДЕМИЈСКОГ А(Н1Н1) ГРИПА

Кључне речи :

Н1Н1, грип, цитокини, Th1, Th2, Th17

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Већина инфекција изазваних новим А(Н1Н1) вирусом грипа протиче као лакше, само-лимитирајуће обољење, но у малом броју оболелих, болест протиче као тешко обољење које захтева хоспитализацију и посебан третман у јединицама за интензивну негу. при чему 40-50% фаталних случајева нема документоване пратеће болести или стања која би се могла означити као фактори ризика за настанак тешких облика инфекције. Улога имунског одговора домаћина у елиминацији новог А(Н1Н1) вируса и имунопатогенези тешке респираторне патологије код оболелих, у овом тренутку није позната. Ранија истраживања SARS, RSV и H5N1 респираторних инфекција утврдила су да је најзначајнија имунопатогенетска карактеристика фаталних респираторних инфекција појава хиперцитокинемиче коју карактерише екстремна продукција и секреција великог броја проинфламаторних цитокина.

Основни циљ планираног истраживања је да се утврде имуно-патогенетски механизми који се налазе у основи тешких инфекција изазваних новим А(Н1Н1) вирусом грипа тј., да се испита цитокински профил (Th1, Th2, Th17) имунског одговора на нови вирус грипа.

У истраживање ће бити укључени пацијенти са клиничком сликом обољења сличном грипу. Испитаници ће бити подељени у две групе: група А - хоспитализовани пацијенти са потврђеном АН1Н1 инфекцијом и тешком клиничком сликом и Група Б - пацијенти са потврђеном АН1Н1 инфекцијом и лакшом клиничком сликом. Контролну групу чиниће здрави испитаници.

Лабораторијска дијагноза новог вируса грипа у брису назофарингса, ће се утврдити **техником РСР**. Поред рутинских клиничких испитивања, свим испитаницима ће се одрђивати фенотип ефекторних, Т регулаторних и дендритских ћелија периферне крви и назофарингеалног испирка **методом проточне цитометрије** и концентрација цитокина неспецифичног имунског одговора, Th1, Th2, Th17 цитокина и титар IgG и IgA антитела специфичних за нови вирус грипа **ЕЛИЗА методом**.



Циљ истраживања

Основни циљ планираног истраживања је да се утврде имуно-патогенетски механизми који се налазе у основи тешких инфекција изазваних новим, пандемијским А(Н1Н1) вирусом грипа тј., да се испита цитокински профил (Th1, Th2, Th17) имунског одговора на нови А(Н1Н1) вирус, као и евентуална повезаност ових параметара са тежином клиничке слике.

Актуелност истраживања

Појава нове, пандемијске варијанте инфлуенца вируса је, поново, у жижу интересовања поставила неразјашњено питање односа вируса и домаћина у фаталним инфекцијама вирусом грипа. Већина инфекција изазваних новим А(Н1Н1) вирусом грипа протиче као лакше, само-лимитирајуће обољење (1), но поред тога у малом броју оболелих, болест протиче као тешко обољење које захтева хоспитализацију и посебан третман у јединицама за интензивну негу (2, 3). Велики број критичних и фаталних случајева се јавља код младих и здравих индивидуа, групи која је ретко погођена тешким обликом болести у случајевима сезонског грипа (4). Док су трудноћа и дијабетес једини до сада идентификовани фактори ризика за настанак тешког облика А(Н1Н1) инфлуенце, чак 40-50% фаталних случајева нема документоване пратеће болести или стања која би се могла означити као фактори ризика за настанак тешких облика инфекције (3, 4, 5). Показано је да нови вирус у односу на сезонски изазива тежа оштећења плућног паренхима (6). Улога имунског одговора домаћина у елиминацији новог А(Н1Н1) вируса и имунопатогенези тешке респираторне патологије код оболелих, у овом тренутку није позната. Остаје отворено питање, зашто код неких, иначе здравих особа, болест поприма малиган ток и доводи до респираторне инсуфицијенције и смртог исхода. Ранија истраживања SARS и RSV респираторних инфекција утврдила су да се у раној фази инфекције продукују цитокини и хемокини који су индикатори неспецифичног имунског одговора, да би се у каснијим фазама цитокински миље померао према ка специфичном имунском одговору са изразитом доминацијом Th1 цитокина код тешких облика инфекција (7). Способност сезонског вируса грипа да индукује хемотактичне и проинфламаторне цитокине је добро позната из ранијих студија које су се бавиле овом проблематиком (8). Најзначајнија имунопатогенетска карактеристика А/Н5Н1 птичијег вируса грипа је појава хиперцитокинемије (цитокинска олуја) коју карактерише екстремна продукција и секреција прекомерних количина великог броја проинфламаторних цитокина (9). Де Јонг и сарадници су доказали изразиту хиперцитокинемију, са доминацијом IL-6, TNF- α , IFN- γ и CXCL-10, код фаталних случајева инфекција птичијим Н5Н1 вирусом грипа (10). Улога Th17 цитокина у тешким облицима инфекција изазваних птичијим, сезонским и новим вирусом грипа до данас није истраживана. Обзиром да се данас сусрећемо са новим типом вируса грипа, који је антигенски различит од сезонског вируса, при чему већина људске популације нема имунитет према овом вирусу, сматрамо да је једна оваква студија, усмерена ка разјашњавању имунопатогенетских механизма који се налазе у основи тешких и фаталних случајева инфекција новим вирусом, ургентна и неопходна.



**Предмет и опис истраживања,
задачи, методологија, очекивани резултати:**

A. Задачи.

1. Утврдити присуство АН1N1 вируса грипа и других вирусних узрочника: RSV, Adenovirus, Coronavirus у брису назофаринкса испитаника.
2. Одредити титар IgG и IgA антитела специфичних за нови АН1N1 вирус грипа у периферној крви и назофарингеалном испирку испитаника.
3. Утврдити присуство и фенотип ефекторних и регулаторних Т-лимфоцита и дендритичних ћелија у периферној крви (и назофарингеалном испирку) испитаника
4. Испитати профил секретованих цитикина (Th1, Th2, Th17) у периферној крви (и назофарингеалном испирку) испитаника.
5. *Ex vivo* утврдити профил секретованих цитикина (Th1, Th2, Th17) у 24h култури мононуклеарних леукоцита периферне крви (и назофарингеалног испирка) испитаника.

B. Пацијенти.

У истраживање ће бити укључени пацијенти са клиничком сликом обољења сличном грипу. Испитаници ће бити подељени у две групе: група А - хоспитализовани пацијенти са потврђеном АН1N1 инфекцијом и тешком клиничком сликом (Температура изнад 38°C, отежано дисање (употребува помоћну респираторну мускулатуру - супраклавикуларно увлачење), убрзано дисање (фреквенција > 30/мин), рентгенски верификована пнеумонија, сатурација крви кисеоником ($SO_2 \leq 92\%$), знаци тешке дехидратације или шока (систолни притисак < 90mmHg, а дијастолни < 60mmHg), измењено стање свести (конфузност, агитираност или конвулзије са поремећајем свести), брза прогресија болести; потребно је да болесник поред повишене телесне температуре изнад 38°C има још неко од наведених стања. Група Б - пацијенти са потврђеном АН1N1 инфекцијом и лакшом клиничком сликом (лако до умерно повишена телесна температура (до 38°C), сув надражајни кашаљ и гушобоља, болови у мишићима и зглобовима, дијареја, респираторна и циркулаторна стабилност). Контролну групу чиниће здрави испитаници.

Ц. Методологија.

Опити протокол:

Испитаницима ће се одмах по постављању клиничке дијагнозе (првих 5 дана од почетка болести) венепункцијом узимати 10мл хепаринизоване периферне крви, брис назофаринкса и 5мл назофарингеалног испирка. Мононуклеарни леукоцити ће се добијати из венске крви и назофарингеалног испирка, помоћу густинског градијента (Lymphorger 1.077) и чувати до извођења есеја на -70°C. Узорци плазме и назофарингеалног испирка, након одвајања ћелија, ће се чувати на -70°C до извођења есеја.

Лабораторијска дијагноза новог АН1N1 вирус грипа у брису назофаринкса, ће се утврдити **техником РСР**. Присуство RSV, Adenovirusa, Coronavirusa ће се утврдити применом **брзих ЕИА тестова**

Клиничка испитивања: Свим хоспитализованим болесницима ће се рутински одређивати: SE, ККС, фибриноген, CRP, уреа, гликемија, хепатограм, креатин - киназа, SO_2 (више пута у току



болести), Rtg плућа, ЕКГ, а по потреби и рН, P02, PC02. Амбулантним пацијентима ће се одрђивати SE, ККС, фибриноген, CRP, SO2 (приликом постављања дијагнозе).

Фенотип ефекторних и Т регулаторних (CD4⁺CD25⁺ Treg, IL-10 Treg, TR1, IFN- γ /IL-10 Th1) и дендритских ћелија (pDC, mDC) периферне крви и назофарингеалног испирка ће се одредити **методом проточне цитометрије**.

Концентрација цитокина неспецифичног имунског одговора (CXCL-10, CCL-2, IFN- α , IFN- β), Th1 цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-15), Th2 цитокина (IL-10, IL-13, TGF- β) Th17 цитокина (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6) и титар IgG и IgA антитела специфичних за нови АН1N1 вирус грипа ће се одређивати у узорцима плазме и назофарингеалног испирка **ЕЛИЗА методом**.

Ex vivo продукција цитокина одређиваће се у 24h култури изолованих мононуклеарних леукоцита периферне крви и назофарингеалног испирка употребом **ЕЛИЗА методе**.

Статистичка обрада: Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима концентрације цитокина, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за т-тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак (IFN- γ), утврђен је дефинитивни број испитаника према групама и то: здрави 20, H1N1 позитивни са тешком клиничком сликом 32, H1N1 позитивни са лакшом клиничком сликом 32, (**укупан узорак од 84**). Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (т-тестом за два независна узорка или Mann-Whitney U тестом) између три групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет СПСС.

Очекивани резултати:

Сходно подацима из литературе који се односе на експерименталне моделе инфекција изазваних вирусом грипа и клиничких студија у којима је испитиван имунски одговор на сезонски вирус грипа, можемо претпоставити да код пацијената са потврђеном инфекцијом и тешком клиничком сликом доминира проинфламаторни одговор који карактеришу висок ниво Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-15) и Th17 цитокина (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6). Имајући у виду протективне механизме само-контроле имунског одговора, можемо очекивати висок ниво серумског IL-10 и TGF- β код критичних пацијената са најтежом клиничком сликом.

Значај истраживања

Експериментални анимални модели и ретке клиничке студије високо патогених инфекција вирусом грипа указују да су претерано активирани инфламаторни одговор и тежина клиничке слике блиско повезани са дерегулацијом продукције цитокина. Претпоставка да претерана активација Th1 и Th17 имунског одговора, са пратећом хиперцитокинемијом и развојем респираторног дистрес синдрома, лежи у основи фаталних, високо патогених инфекција новим АН1N1 вирусом грипа, отвара могућност терапијске примене нове генерације антиинфламаторних имуномодулаторних лекова, који могу не само да смање активацију Th1 и Th17 ћелија, а на тај начин и да спрече колатерално имунопатолошко оштећење плићног ткива, већ и да спрече настанак леталних случајева инфекција



Временски оквир

Сходно величини студијског узорка (здрави 20, H1N1 позитивни са тешком клиничком сликом 32, H1N1 позитивни са лакшом клиничком сликом 32, **(укупан узорак од 84)** и броју оболелих који су у протекла два месеца хоспитализовани на Инфективној Клиници КЦ у Крагујевцу са клиничком сликом обољења сличном грипу, предвиђено је да ова студија траје 3-6 месеци.

Литература

1. Nicoll A, Coulombier D: Europe's initial experience with pandemic (H1N1) 2009 - mitigation and delaying policies and practices. *Euro Surveill* 2009, 14:19279.
2. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, *et al*: Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med* 2009, 361:1935-44
3. Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, *et al*: Critically Ill Patients With 2009 Influenza A(H1N1) Infection in Canada. *Jama* 2009, 302:1872-9
4. Vaillant L, La Ruche G, Tarantola A, Barboza P: Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. *Euro Surveill* 2009, 14: 19309
5. Chowell G, Bertozzi SM, Colchero MA, *et al*: Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza. *N Engl J Med* 2009, 361:674-679.
6. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, *et al*: In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 2009, 460:1021-1025.
7. Cameron MJ, Ran L, Xu L, *et al*: Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Virol* 2007, 81:8692-8706.
8. Green, J.A., R.P. Charette, T.J. Yeh, and C.B. Smith. 1982. Presence of interferon in acute- and convalescent-phase sera of humans with influenza or an influenza-like illness of undetermined etiology. *J. Infect. Dis.* 145:837-841.
9. Baskin CR, Bielefeldt-Ohmann H, Tumpey TM, *et al*: Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:3455-3460
10. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, *et al*: Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006, 12:1203- 1207.



Руководилац пројекта:

Доц. др Дејан Баскић

Главни истраживач:

Доц. др Дејан Баскић

Ангажовани истраживачи:

Проф. др Небојша Арсенијевић

Проф. др Предраг Чановић

Проф. др Олгица Гајевић

Доц. др Жељко Мијаиловић

Сузана Поповић, истраживач сарадник

Биљана Поповска, сарадник у настави