Особенности секреции цитокинов у больных с ограниченными гнойно-воспалительными жидкостными скоплениями брюшной полости

А.В. Наумов[1,2], А.М. Мануйлов[2]

[1]Краснодарская клиническая больница скорой медицинской помощи

[2]Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

Цитокины, представляя из себя продукты активированных клеток, главным образом иммунной системы, являются ее регуляторными и эффекторными молекулами, модулирующими процессы повреждения, воспаления, элиминации эктопических и метаплазированных клеток, супрессии и даже регенерации (ростовые и колониестимулирующие факторы). Исследование секреции цитокинов может стать информативным тестом, отражающим как активность местного воспалительного процесса, так реакции отдельных звеньев иммунной системы в условиях иммуноориентированной терапии [1, 2].

При различной соматической патологии, инфекционных заболеваниях и развитии неблагоприятных последствий воздействия на организм факторов внешней среды работа цитокиновой сети нарушается. Возникает функциональный дисбаланс системы цитокиновой регуляции, а затем структурно-морфологический дисбаланс всей системы иммунореактивности. Это проявляется в уменьшении количества иммунокомпетентных клеток, возникновении их функциональной несостоятельности (анергии), повышении или снижении продукции эффекторных и регуляторных молекул, в аномальной экспрессии молекул клеточной адгезии. В результате формируются иммунные дисфункции, клинически проявляющиеся различными синдромами. В частности, при неблагоприятном развитии инфекционного процесса и гнойно-септической патологии нередко наблюдается дисбаланс между функциональными группами цитокинов, и одновременно развивается иммунодепрессия, которая может быть связана в том числе с нарушением взаимодействия между моноцитами/макрофагами и Т-лимфоцитами [3–5]. Необходим поиск современных методов коррекции иммунологических дисфункций, этиологическим предиктором которых явились инфекционные и воспалительных дисфункции.

Препаратом с возможными как системными, так и местными (интраперитонеальным) иммунокорригирующими эффектами является Ронколейкин®. Ронколейкин® – это современный отечественный биотехнологический продукт, генноинженерный аналог эндогенного цитокина – интерлейкнна-2 (IL-2) человека. Рекомбинантную форму IL-2 (rIL-2) получают методами генной инженерии и биотехнологии из клеток продуцента – рекомбинантного штамма непатогенных пекарских дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которых встроен ген человеческого интерлейкина [6, 7].

Активной субстанцией Ронколейкина® является одноцепочечный полипептид из 133 аминокислот с молекулярной массой 15,3±0,2 кДа. В отличие от бактериального rIL-2 Ронколейкин® полностью структурно аналогичен пептидному компоненту rIL-2 человека и от эндогенного цитокина отличается только отсутствием полисахаридного фрагмента. В молекуле эндогенного IL-2 существует один участок гликозилирования, однако его наличие не влияет на функцию, но увеличивает длительность циркулирования цитокина в крови [8].

Основная цель использования Ронколейкина® в качестве медицинского препарата – это восполнение дефицита и воспроизведение биологической активности в организме эндогенного IL-2, одного из важных компонентов системы полипептидных медиаторов – цитокинов [9].

Вышесказанное обусловило цель проведенного исследования, которая состояла в изучении влияния рекомбинантной формы IL-2 (Ронколейкин®) на цитокиновый спектр иммунной системы у больных с ограниченными гнойно-воспалительными жидкостными скоплениями (ОГВЖС) брюшной полости при его местном (внутриперитониальном) и системном (подкожном) введении.

Материалы и методы

В исследование включены 202 пациента с ОГВЖС брюшной полости за период с 2002 по 2009 гг. Все пациенты были разделены на три репрезентативные группы исследования: две основные (I и II) и группу сравнения (III). Группу I составили 60 пациентов; группа II сформирована из 113 больных и 29 обследуемых входили в группу сравнения.

Больным первой группы наряду с традиционными методами лечения: дезинтоксикации, антибактериальной и противовоспалительной терапией проводилась малоинвазивная хирургия – пункция и дренирование гнойного очага под УЗ-контролем с последующим интраперитонеальным введением 250000 ЕД Ронколейкина® в 0,9% растворе хлорида натрия в объеме 50 мл, также одновременно препарат в той же дозе вводился системно в виде подкожных инъекций в две точки в объеме 1 мл. Процедуру повторяли дважды с интервалом 48 ч. В группе II лечение ограничивалось только проведением пункции и дренирования гнойного очага под УЗ-контролем в сочетании с традиционной, представленной выше терапией.

Группа сравнения сформирована из условно здоровых пациентов, обратившихся в хирургическое отделение с болевым синдромом и у которых после проведенного комплексного клинико-диагностического обследования данных за острую хирургическую, гнойную патологию органов брюшной полости выявлено не было.

Исследовался цитокиновый спектр плазмы периферической крови пациента, в частности секреция провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8 и TNF-α. Концентрацию цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α в сыворотке крови определяли твердофаз-

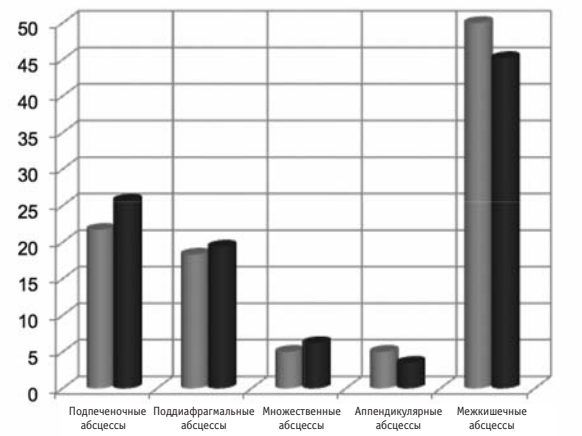
ным иммуноферментным методом с использованием наборов и по прилагаемым методикам (Cal-tag Laboratories, USA). Регистрацию производили на комплексе приборов фирмы Anthos.

Пункция отграниченных гнойных очагов в брюшной полости выполнялась с использованием ультразвуковых приборов Aloka SSD-500 (Япония) с конвексным (с пункционным адаптером) датчик 3,5 мГц. В работе использовались комплекты специального одноразового оборудования (иглы, проводники, расширители, дренажи Malecot и Pigtail) фирмы Cook (Дания).

Анализ результатов исследования проводился до начала лечения больного, на 8-е и 13-е сутки проводимой терапии.

Статистическая обработка проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 6,0 и Biostat 2008.

Распределение больных с внеорганными гнойно-воспалительными образованиями в зависимости от методов лечения (в %).



Результаты исследования

Результаты лечения больных обеих групп с ОГЖВС изучены по нозологическим принципам, что отражено на рисунке.

Как следует из таблицы в группе здоровых добровольцев (группа сравнения) сывороточная концентрация провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8 и TNF-α была минимальной и находилась в большинстве случаев почти на пределе чувствительности метода.

При поступлении на лечение у больных с ОГВЖС концентрация IL-1β была увеличена в среднем в 5 раз (p<0,001), IL-6 – в 5,25 раза (p<0,001), TNF-α – в 2,72 раза (p<0,01) и IL-8 – в 6,6 раза (p<0,001), что подтверждалось сравнительным анализом показателей. При этом наметившиеся существенные особенности в секреции провоспалительных лимфокинов в группах обследуемых больных объяснялись достоверными различиями концентраций цитокинов в плазме крови. В частности, секреция IL-1β в группе сравнения до начала лечения достоверно была ниже (t=4,5 и t=4,1, p<0,001), чем в основных группах I и II. Данный факт свидетельствовал о наличии выраженного воспалительного процесса, вернее всего бактериальной этиологии, но без фатальной антигенемии с развитием иммунопатологических состояний. Аналогично наметились на высокодостоверном уровне различия в представленных группах и в показателях концентрации лимфокина IL-6 (t=4,2 и t=4,8, т. е. p<0,001), а также TNF (t=3,0 и t =2,8, т. е. p<0,01). При этом стоит отметить, что статистическое сравнение уровня секреции IL-8 между основной группой I и группой сравнения III до начала проведения этиотропного лечения также обнаружило достоверные различия в секреции цитокина (t=2,3, т. е. p<0,05), однако различия между группами II и группой сравнения находились за границами доверительной вероятности «p» и расценивались нами как тенденция (t=1,7, т. е. p<0,1).

После окончания курса иммунотропной терапии, то есть на фоне продолжающихся эффектов Ронколейкина®, концентрация IL-1b в I основной группе повысилась по сравнению с исходной в 1,76 раза (p < 0,05), IL-6 – в 1,78 раза (p<0,05), в то время как концентрации IL-8 и TNFα снизились соответственно в 2,08 и 1,53 раз (p<0,01; p<0,05), о чем свидетельствовали результаты статистического сравнения. Уровень не связанного с мембраной IL-1 оказался достоверно выше на 8-е сутки лечения (при внутригрупповом анализе секреции интерлейкина (t=2,2, т. е. p<0,05), также как и концентрация IL-6 (t=2,0, т. е. p<0,05). При этом следует отметить, что в основной группе II на этом сроке исследования в той или иной степени имело место снижение сывороточной концентрации всех цитокинов, но без достижения ими значений группы сравнения, о чем свидетельствовали результаты статистического сравнения, в частности: $t_{IL\text{-}1\beta\ II\ до\ лечения\text{-}II\ 8\ с\ лечения}$=0,7, т. е. p<0,05; $t_{IL\text{-}6I\ I до\ лечения\text{-}II\ 8\ с\ лечения}$=1,3, т. е. p<0,05; $t_{IL\text{-}8II\ до\ лечения\text{–}II\ 8\ сут\ лечения}$ = 0,4, т.е. p<0,05. Проявившиеся достоверные различия в снижении концентрации TNF группы II (при внутригрупповом сравнении t=2,0, т. е. p<0,05), с нашей точки зрения рассматривается скорее как эпизодич-

Концентрация цитокинов в сыворотке крови больных с ОГВЖС в процессе мониторинга (M±m)

Группы		Показатели			
		IL-1β, пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-8, пг/мл	TNF-α, пг/мл
Группа сравнения III		3,4±0,8°°	6,4±1,1**°°	11,3±2,7***	16,7±2,9****•°°°
До начала лечения	I	16,9±2,9*•	33,6±6,4**••	79,3±27,4***	45,7±9,3****
	II	17,3±3,3°	31,1±5,1°°	75,2±38,9	46,4±10,1°°°•
8-е сутки лечения	I	29,7±4,9•^	59,9±11,2••^^	38,1±6,2^^^	29,9±4,8
	II	13,8±3,4^	22,3±4,7^^	59,6±8,7^^^	24,7±4,1•
13-е сутки лечения	I	3,9±0,9	8,1±1,3	13,9±2,8	13,3±3,5
	II	9,4±1,9	10,7±2,9	21,3±3,3	17,2±3,4

*Примечание. Достоверность различий t-критерий Стьюдента. *В сравнениях: IL-1β группа III–I (до лечения) t=4,5, (p<0,001); **IL-6 группа III–I (до лечения) t=4,2, (p<000,1); ***IL-8 группа III–I (до лечения) t=2,3, (p<0,05); ****TNF группа III–I (до лечения) t=3,0, (p<0,01); °IL-1β группа III-II (до лечения) t=4,1, (p<000,1); °°IL-6 группа III–II (до лечения) t=4,8, (p<000,1); °°°TNF группа III–II (до лечения) t=2,8, (p<0,01); • IL-1β группа I (до лечения) – I (8 сут лечения) t=2,2, (p<0,05); •• IL-6 группа I (до лечения) – I (8 сут лечения) t=2,0, (p<0,05); •TNF группа II (до лечения) – II (8 сут лечения) t=2,8, (p<0,01); ^ IL-1β группа I–II t=4,3, (p<0,001); ^^ IL-6 группа I–II t=3,2, (p<0,001); ^^^ IL-8 группа I–II t=2,8, (p<0,01).

ность, а не системность за счет высокой дисперсионности, обусловленной присутствием в группе нескольких больных с низкими показателями TNF, приближающихся к референтным значениям.

На уровне тенденций оказались различия в секреции IL-8 и TNF в основной группе I при сравнении показателей до и на 8-е сутки лечения внутри группы (t = 1,5).

Концентрации IL-1β и IL-6 в основной группе I более чем в 2 раза (p<0,01) превышали аналогичные параметры основной группы II (t=4,3 и t=3,2, т. е p<0,001), а концентрация IL-8 у пациентов первой группы была достоверно более низкой, чем в группе II (t=2,0, т. е. p<0,05), с отсутствием различий в концентрации TNF между группами (t = 0,8, т. е. p>0,05). Ввиду того, что лечение, проводимое пациентам I и II групп за исключением иммунотропной терапии, было идентичным, данные эффекты можно отнести только за счет прямых и опосредованных эффектов Ронколейкина®.

К 13-м суткам мониторинга концентрация исследованных цитокинов в сыворотке крови пациентов основной группы, в комплексную терапию которых включалось системное и местное применение Ронколейкина®, значительно снизилась и практически не отличалась от соответствующих значений здоровых людей. Что касается пациентов II группы, то, несмотря на значительное снижение, сывороточная концентрация IL-1β и IL-8 по-прежнему достоверно превышала как значения контроля, так и параметры основной группы.

Обсуждение результатов

По мнению В.К. Козлова [8, 10], А.Ю. Анисимова [11], широкий спектр биологических эффектов IL-2 позволяет понять, почему рекомбинантные препараты этого цитокина рассматриваются специалистами как потенциальные средства терапии вторичной иммунной недостаточности. Опыт практического использования рекомбинантных препаратов IL-2 в различных клинических ситуациях показал, что они не только восстанавливают количество иммунокомпетентных клеток, но и увеличивают их функциональную активность, в частности цитотоксичность специфических и естественных киллеров, а также активированных моноцитов; способность различных клеток к синтезу цитокинов и эспрессии молекул клеточной адгезии, способность активированных плазматических клеток секретировать иммуноглобулины большинства изотипов и, наконец, повышается устойчивость клеток к программированной клеточной гибели – апоптозу. Полученные результаты проведенного исследования согласуются с данными литературы и позволяют говорить о выраженных положительных иммунокорригирующих эффектах IL-2, в частности препарата Ронколейкин®. По рекомендации А.Л.Костюченко [12], В.А. Лазановича и др. [13] Ронколейкин®, как компонент патогенетической терапии, у пациентов с гнойно-септической патологией должен использоваться после санации хирургически значимых очагов инфекции. Его назначают вместе со средствами детоксикационной терапии, гиперэнергетическим питанием, анаболиками и антиоксидантами, а также всеми необходимыми препаратами симптоматической терапии.

Ронколейкин® хорошо сочетается с антибиотиками, детоксицирующими средствами, иммуноглобулинами и другими применяемыми при лечении гнойно-септической патологии лекарственными препаратами [14].

Таким образом, наличие у рекомбинантного IL-2 – препарата Ронколейкин® – многосторонней биологической активности предоставляет возможность применять его не только для коррекции иммунной недостаточности, но и для оптимизации функционирования всей системы иммунореактивности при ее адаптации к воздействиям специфических и неспецифических стимулов [15]. Использование данного иммунокорректора в комплексных схемах лечения хирургических больных позволяет предотвращать развитие тяжелых гнойно-септических осложнений, существенно влияет на течение развившейся гнойно-септической патологии и на ее исход.

Литература

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: 2008; 552.

2. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции. Цитокины и воспаление. 2004; 3: 2: 16–23.

3. Смирнов М.Н., Гринев М.В., Громов М.И., Тарелкина М.Н., Пивоварова Л.П., Широков Д.М, Разумова Н.К. Цитокиновая терапия хирургического сепсиса Ронколейкином® . Тезисы докладов V Российского национального конгресса «Человек и лекарство».М.: 1998; 197.

4. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: 2000; 432.

5. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: 1999; 608.

6. Мясников А.Н., Смирнов М.Н., Авот А.Я., Грен Э.Я. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК pJDB (MSIL), обеспечивающая синтез интерлейкина-2 человека в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способ ее получения и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – продуцент интерлейкина-2 человека. Патент SU № 1770359 Дата приоритета 24.03.92.

7. Смирнов М.Н., Хромов-Борисов Н.Н. Ронколейкин® – интерлейкин-2 человека рекомбинантный дрожжевой: производство и клинические испытания. Материалы II-й международной конференции «СПИД, рак и родственные проблемы». СПб.: 1995; 77.

8. Козлов В.К. Иммунопатогенез и цитокинотерапия хирургического сепсиса. Вестник РВМА. 2002; 2 (8): 12–22.

9. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммунотерапевтических воздействий при лечении сепсиса. Медицинская иммунология. 2001; 3: 3: 415–429.

10. Козлов В.К. Дисфункция иммунной системы в патогенезе сепсиса: возможности диагностики. Цитокины и воспаление. 2006; 5: 2: 15–29.

11. Анисимов А.Ю. Иммунотерапия Ронколейкином® в комплексном лечении больных абдоминальным сепсисом. Пособие для врачей. Казань, 2004; 28.

12. Костюченко А.Л. Ронколейкин®: иммунокоррекция в лечении сепсиса. СПб.: 2000; 11 .

13. Лазанович В.А., Смирнов Г.А., Маркелова Е.В., Силич Е.В., Семехин А.И., Корявченкова И.В. Ронколейкин® в лечении септических больных. Медицинская иммунология. 2000; 2:2: 224.

14. Рожков А.С., Лебедев В.Ф., Кобиашвили М.Г. Сепсис. Избранные вопросы терапии инфекционных больных. Руководство для врачей. СПб.: 2005: 855–878.

15.Останин А.А. Иммунопатогенетические аспекты и цитокинотерапия хирургических инфекций. Афтореф. дисс. на соиск. ученой степени докт. мед . наук. СПб.: 1999; 44.