

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2 (РОНКОЛЕЙКИНОМ) У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ

А.С. Борисов, Т.В. Мухоедова

ФГУ «Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина Росздрава»

Кардиохирургические больные с инфекционным эндокардитом (ИЭ) остаются группой высокого риска в отношении инфекционных осложнений послеоперационного периода. С целью профилактики и лечения инфекционных осложнений применялся препарат рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкин). Проведено контролируемое проспективное исследование. Обследован 61 больной приобретенными пороками сердца (ППС) с ИЭ; контрольную группу составили 30 пациентов. Найдены особенности влияния ронколейкина на иммуновоспалительную реактивность у больных ППС с ИЭ. Клиническая эффективность применения интерлейкина-2 составила 52%.

Инфекционные осложнения в послеоперационном периоде до настоящего времени являются одним из факторов, снижающих результаты хирургической коррекции ППС. В связи с совершенствованием уровня оказания хирургической помощи в последние десятилетия значительно увеличилось количество больных с исходно скомпрометированным иммунным статусом, пропорционально возросла доля пациентов с высоким риском инфекционных осложнений в послеоперационном периоде [4]. Наряду с комбинированным характером порока, повторными операциями, ведущим фактором риска у больных ППС считается активный ИЭ [1].

Общая летальность, несмотря на современную мощную антибактериальную терапию, при активном ИЭ после протезирования клапанов сердца, по данным литературы, достигает 20–25%. Недостаточная эффективность традиционной антибиотикотерапии обычно связана с быстрым формированием резистентности микрофлоры. Инфекционный эндокардит сопровождается выраженными иммунными дисфункциями, которые могут иметь как локальный, так и системный характер [6]. Также нельзя не учитывать как фактор послеоперационной иммунодепрессии проводимую интенсивную медикаментозную терапию, включающую в себя введение большого количества антибактериальных препаратов (фторхинолоны, макролиды), катехоламинов (дофамин, адреналин), глюкокортикоидов [7, 8].

В современных медицинских технологиях имеется ряд рекомбинантных цитокинов (гранулоцитарно-колониестимулирующий фактор, интерлейкин-1, интерлейкин-2 (IL-2), гамма-интерферон и т. д.), способных оказывать не-

посредственное влияние на иммунный статус. Наибольшее распространение в практике отечественной медицины получил препарат рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкин). Интерлейкин-2 – это один из ключевых факторов кооперативного взаимодействия клеток специфической иммунной защиты, обеспечивающий как активную пролиферацию, так и полноценную функциональную активность Т-клеточного звена иммунитета, последний имеет первостепенное значение для противоинфекционной защиты. Основными эндогенными продуцентами интерлейкина-2 являются активированные CD4+ лимфоциты (90% продукции эндогенного интерлейкина-2), а также цитотоксические CD8+ лимфоциты (10% продукции эндогенного интерлейкина-2) [5].

В качестве препарата для лечения сепсиса рекомбинантный интерлейкин-2 (пролейкин) был впервые использован и запатентован в 1989 г. в Германии. Интерлейкин-2 обладает многогранной биологической активностью, интегральный результат его действия – формирование адекватной иммунореактивности в условиях специфической активации; он не относится к ксенобиотикам, в силу чего безопасен; являясь аналогом естественного компонента иммунорегуляции, легко встраивается в цепочку нормального иммунного ответа и характеризуется однозначным и контролируемым эффектом [2, 3].

Тем не менее в настоящее время преимущественной сферой применения этого препарата за рубежом является онкология. Напротив, по данным отечественной литературы, начиная со второй половины 1990-х годов, этот препарат широко применяется при ряде заболеваний,

особенно активно в лечении хирургического сепсиса и других инфекционных осложнений в качестве иммуномодулятора. Из подробного анализа этих литературных данных складывается впечатление, что рекомбинантный интерлейкин-2 (ронколейкин) оказывает выраженное стимулирующее влияние практически на все звенья иммунитета, начиная от неспецифического (фагоцитоза), заканчивая антителообразованием. Данные большинства работ основаны на малых группах и не являются контролируемые и рандомизированными исследованиями, что снижает информативность полученных данных о ронколейкине как «идеальном» иммуномодуляторе. Однако это не вполне согласуется с его преимущественной точкой приложения, а именно – непосредственным влиянием на Т-лимфоциты со стимуляцией пролиферации и дифференцировки. Также недостаточно данных о клинической эффективности рекомбинантного интерлейкина-2 в лечении ИЭ.

В связи с этим актуально исследование эффективности рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкина) у кардиохирургических больных ППС с ИЭ. Цель исследования – изучить эффективность рекомбинантной цитокинотерапии с использованием интерлейкина-2 (ронколейкина) у больных ППС после кардиохирургических вмешательств.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено проспективное обследование 61 больного, в возрасте от 19 до 60 лет, оперированного в условиях искусственного кровообращения (ИК) в Новосибирском НИИ патологии кровообращения с 2000 по 2004 г. (табл. 1). Критериями отбора были: наличие ИЭ по критериям Duke (1994) при первичном ИЭ или модифицированным критериям Duke при протезном эндокардите, соответствующих категории «достоверный», а также проведенная оперативная коррекция клапанных пороков. Критерии исключения: возраст менее 15 и старше 65 лет, летальный исход в течение первых двух суток после операции, сопутствующее новообразование.

Пациентам основной группы (n=31) после операции со вторых суток дополнительно проводили курс экстракорпоральной иммуномодуляции (ЭИМ) из двух процедур с использованием отечественного рекомбинантного препарата интерлейкина-2 – ронколейкина. Контрольная группа (n=30) получала традиционную консервативную терапию. Рандомизация проводилась парным методом. Как следует из представленных данных, основная и контрольная группы были сопоставимы по основному заболеванию, полу и возрасту. Незначительные различия в обеих группах не зависели от отбора больных и могут быть отнесены к так называемой «систематической» ошибке как следствие влияния случайных неучитываемых факторов.

Во всех исследуемых группах преобладала умеренная продолжительность ИК (менее 2 ч), 51,6 и 50,0%, соответственно. Характер анестезиологического пособия и средняя длительность ИК между группами существенно не различались. Искусственное кровообращение проводилось при умеренной гипотермии 30,9 °С и объемной скорости перфузии 2,5 л/м².

Лабораторные методы исследования включали основные звенья иммунновоспалительного ответа: число лейкоцитов в крови ($L \times 10^9$), относительное и абсолютное число нейтрофилов (Нф, % и кл/мл), показатели клеточного и

Таблица 1

Показатели	Группа	
	основная (n=31)	контрольная (n=30)
Возраст, годы	41,9±1,51	42,5±1,48
Пол		
мужской	20 (64,5%)	20 (67%)
женский	11 (35,5%)	10 (33%)
Инфекционный эндокардит		
первичный	11 (35%)	8 (27%)
вторичный	20 (65%)	22 (73%)
Протезирование клапана		
аортального	7 (22,5%)	8 (27%)
митрального	15 (48%)	11 (35,5%)
трехстворчатого	4 (13%)	2 (7%)
Двух-трехклапанная коррекция	9 (29%)	7 (23%)
Повторные операции	7 (22,5%)	3 (10%)
Исходный III–IV ФК	29 (93,5%)	24 (80%)

гуморального иммунитета. Состояние иммунного статуса оценивалось у 61 больного по относительному (%) и абсолютному (кл/мл) количеству Лф, Т-популяции (CD3) и субпопуляций Т-хелперов (CD4) и Т-супрессоров (CD8), В-популяции (CD22) лимфотоксическим методом с использованием моноклональных антител. У всех больных определялись ЦИК (опт. ед.) и содержание иммуноглобулинов (Ig, г/л) А, М, G в сыворотке крови нефелометрическим методом с использованием наборов фирмы «Синтеко» (Москва). Для оценки метаболической активности полиморфноядерных нейтрофилов у 61 больного исследован спонтанный и стимулированный тест с окраской нитросиним тетразолием (НСТ-тест, %). Разница между индуцированным (иНСТ) и спонтанным (сНСТ) НСТ-тестом считалась показателем резерва реактивности нейтрофилов (РРН).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение динамики абсолютного содержания CD4, CD8 и CD16 выявило достоверные различия внутри групп (табл. 2). На протяжении всего периода наблюдения, несмотря на различия в абсолютном количестве Т-хелперов, Т-супрессоров и НК-клеток между группами на I этапе исследования, различался сам характер динамики их пролиферативной реакции. На 12–14-е сутки после операции абсолютное количество CD4, CD8 достоверно возрастало по сравнению с I этапом в основной группе ($p < 0,05$). Напротив, в контрольной группе на II этапе регистрировалось снижение абсолютных показателей CD4, CD8 на 23 и 25% соответственно, без достоверных различий внутри

группы ($p > 0,05$). На третьем этапе картина динамики количественных показателей Т-хелперов и Т-супрессоров по абсолютным значениям была аналогичной (табл. 2). Значения CD4 и CD8 на 12–14-е сутки после операции в основной группе сохранялись на более высоком уровне, чем в контрольной группе, где их количество оставалось резко сниженным.

Для анализа влияния проводимой терапии на гуморальное звено иммунитета, а также проверки гипотезы о влиянии рекомбинантной цитокинотерапии на баланс $T \times 1/T \times 2$ был проведен статистический анализ абсолютного и относительного содержания В-клеток (CD22) и продуцируемых ими основных защитных классов иммуноглобулинов (табл. 3). В функциональном состоянии гуморального иммунитета по содержанию сывороточных иммуноглобулинов зарегистрирована следующая динамика параметров. Изменение IgM в основной группе составило $1,49 \pm 0,95$ г/л (2–4-е сутки); $1,85 \pm 1,24$ г/л (12–14-е сутки); в контрольной группе $1,5 \pm 3,78$ г/л (2–4-е сутки); $1,7 \pm 2,05$ г/л (12–14-е сутки). Внутри- и межгрупповые различия не достигали достоверных различий ($p > 0,05$). В отношении IgA и IgG значимых изменений не обнаружено.

В обеих группах достоверно регистрировался повышенный уровень ЦИК (до 187 опт. ед.) на 3-и–4-е сутки после операции – $81,2 \pm 69,5$ в основной и $78,36 \pm 61,4$ в контрольной группах, с превышением нормальных показателей (0–55 опт. ед.) в среднем на 47% ($p < 0,05$). Данный факт, в целом, может свидетельствовать как об активации ИЭ, так и о недостаточности функции элиминации ЦИК в первую неделю после воздействия операционно-перфузионного стрес-

Таблица 2

Сравнительная динамика абсолютных показателей CD4, CD8, CD16 у больных с ИЭ в послеоперационном периоде

Показатели	Группа	После операции, сутки		
		2–4-е	5–7-е	12–14-е
CD4 (600–1000 кл/мл)	основная	$398,0 \pm 155,0^*$	$545,0 \pm 286,0^*$	$462,5 \pm 271,0$
	контрольная	$324,0 \pm 127,0$	$353,0 \pm 179,0$	$389,0 \pm 129,0$
CD8 (300–700 кл/мл)	основная	$285,0 \pm 111,0$	$335,7 \pm 181,0$	$315,9 \pm 124,0$
	контрольная	$196,0 \pm 144,4$	$139,0 \pm 70,8$	$152,0 \pm 79,6$
CD16 (100–500 кл/мл)	основная	$215,5 \pm 123,0^*$	$298,0 \pm 144,0^*$	$243,0 \pm 135,0$
	контрольная	$210,2 \pm 162,0$	$225,3 \pm 148,0$	$238,0 \pm 183,0$

* $p < 0,05$ достоверность различий внутри групп

са. В дальнейшем динамика ЦИК составила $79 \pm 35,5$ и $83,48 \pm 66,53$ на 5–7-е сутки, $75,3 \pm 32,6$ и $89,08 \pm 67,66$ опт. ед. на 12–14-е сутки, соответственно в основной и контрольной группах.

По мнению исследователей, спонтанный НСТ-тест считается достаточно информативным критерием метаболической активности Нф, а индуцированный НСТ-тест может регистрировать очаг воспаления и резервы биоцидности Нф. Разница между сНСТ и иНСТ составляет резерв реактивности нейтрофилов. Снижение его ниже 15–20% свидетельствует об истощении кислородзависимых факторов макрофагального звена.

С целью выяснения гипотезы, влияет ли ронколейкин на кислородзависимую биоцидность фагоцитов у больных с ИЭ, проведено следующее исследование. На 2–4-е сутки после операции найдены в целом нормальные показатели сНСТ в обеих группах. Достоверных различий во внутригрупповой динамике в показателях сНСТ найдено не было. Достоверных различий на этапах исследования в основной группе отмечено не было. В контрольной группе достоверных изменений не найдено, отмечена тенденция к снижению сНСТ на II и III этапах исследования ($p > 0,05$).

Для оценки эффективности проводимой терапии с использованием ронколейкина были следующие критерии: гипертермия более 10 суток после операции, наличие инфекционных осложнений. Эффективность использования ронколейкина у кардиохирургических больных с ИЭ в 48% случаев (15 пациентов) отсутствовала. В контрольной группе это значение составило 77% (23 пациента), таким образом были найдены достоверные различия в эффективности ронколейкина в основной группе по сравнению с контрольной по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Достаточно интересным наблюдением в динамике абсолютных показателей CD4, CD8, CD16 является зарегистрированная напряженность и характер пролиферативной реакции натуральных киллеров в основной группе. Была отмечена четкая тенденция к росту числа натуральных киллеров в группе, получавшей IL-2, с достоверными внутригрупповыми различиями между I–II этапами исследования. Межгрупповые различия на II этапе исследования свидетельствуют о закономерности указанных девиаций. В целом, аналогичная реакция NK-клеток является признаком усиления неспецифической защиты организма как следствие использования иммуномодулятора интерлейкина-2. Таким образом, применение интерлейкина-2 по разработанной методике четко улучшало пролиферативный статус CD4 и CD16. Различия между группами достоверны.

Из приведенных относительных показателей видно, что имелось 2 различных типа динамики CD22 (табл. 3). В основной группе на 5–7-е сутки после операции регистрировалось достоверное возрастание относительных значений в сравнении со 2–4-и сутками после операции ($p < 0,05$). На 12–14-е сутки после операции отмечалось практически полное восстановление относительных цифр CD22 к уровню первого этапа (превышение всего на 12%). В контрольной группе фиксировалась недостоверная динамика относительных значений В-лимфоцитов, с тенденцией к снижению как на 5–7-е, так и на 12–14-е сутки после операции ($p > 0,05$). Дальнейший анализ абсолютных показателей CD22 подтвердил закономерность и достоверность повышения в основной группе на 22% на 5–7-е сутки после операции, с последующей стабилизацией на III этапе исследования ($p < 0,05$).

Таблица 3

Динамика показателей В-лимфоцитов у больных с ИЭ в послеоперационном периоде

Показатели	Группа	После операции, сутки		
		2–4-е	5–7-е	12–14-е
CD22, % (10–20%)	основная	$16,3 \pm 4,84$	$18,59 \pm 3,46^*$	$15,07 \pm 3,31$
	контрольная	$13,57 \pm 5,43$	$15,42 \pm 15,9$	$15,69 \pm 4,19$
CD22, кл/мл (100–500 кл/мл)	основная	$390,5 \pm 172,3$	$492,3 \pm 195,4^*$	$362,4 \pm 234,7$
	контрольная	$364,14 \pm 247,5$	$435,6 \pm 282,2$	$359,0 \pm 24,2$

* $p < 0,05$ достоверность различий внутри групп

В контрольной группе регистрировалась недостоверная тенденция к снижению абсолютных показателей В-лимфоцитов на втором и третьем этапах анализа ($p > 0,05$). В целом, в контрольной группе на 5–7-е сутки после операции регистрировалось уменьшение циркулирующей CD22-популяции без достоверных различий между этапами исследования. На 12–14-е сутки не отмечалось достоверного межгруппового различия в отношении количественного содержания В-лимфоцитов.

Анализ содержания Ig классов А, М, G на последующих этапах показал, что, несмотря на достоверные внутригрупповые различия в их динамике, существенного влияния интерлейкина-2 на плазменные концентрации IgG и IgA не найдено. В отношении IgM была отмечена лишь недостоверная тенденция к увеличению содержания.

Отсутствие достоверной динамики IgG может объясняться физиологической латентностью увеличения синтеза этого класса иммуноглобулинов наличие так называемого «лаг-периода» (до 2 нед.) в отличие от IgM (1 нед.).

В отношении фагоцитарной функции нейтрофилов по результатам анализа, использование ронколейкина у больных ИЭ в послеоперационном периоде достоверно не влияло на исходно сниженный сНСТ и стабилизацию субнормальных показателей иНСТ. Сниженные уровни сНСТ к 12–14-м суткам не восстанавливались.

Данные факты свидетельствуют о признаках ранней декомпенсации внутриклеточных метаболических резервов нерезидентных фагоцитов. Наиболее характерным типом нарушений было замедленное восстановление кислородпродуцирующей активности фагоцитов. В целом отмеченное снижение деструктивного потенциала, даже в пределах нормальных значений, безусловно, отрицательно отражалось на биоцидности нейтрофилов, являясь значительным дефектом противомикробной защиты. Достоверного влияния рекомбинантной цитокинотерапии на фагоцитарную функцию нейтрофилов также не было найдено.

ВЫВОДЫ

1. В послеоперационном периоде у больных ППС с ИЭ типичными нарушениями эффекторного звена иммунитета являются: пролонгированная депрессия Т-лимфоцитов и метаболическая дисфункция нейтрофилов со сниженным биоцидным потенциалом.
2. Использование ронколейкина способствует восстановлению функционального и пролиферативного статуса Т-клеточного звена лимфоцитов преимущественно за счет субпопуляций CD4 и CD16.
3. Убедительного влияния ронколейкина на фагоцитарную функцию нейтрофилов и продукцию антител не найдено.
4. Клиническая эффективность применения ронколейкина у больных ППС с ИЭ составила 52%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Караськов А.М., Шукин В.С., Козырь А.М. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 1999. № 1. С. 20–23.
2. Козлов В.К. Ронколейкин: биологическая активность, иммунокорректирующая эффективность и клиническое применение. СПб.: СПбУ, 2002. 81 с.
3. Козлов В.К. Возможности современной иммунотерапии: Матер. III науч.-практ. конф. «Современные методы лечения и диагностики иммунопатологии». Самара, 2001. С. 14–15.
4. Мешалкин Е.Н., Бушманова Г.М. и др. Современное состояние проблемы хронического септического эндокардита в кардиохирургии // Септические эндокардиты в хирургии пороков сердца: Тезисы Респ. конф. Новосибирск, 1988. С. 4–9.
5. Balkwill F.R. (ed.). *Cytokine Cell Biology: A Practical Approach*. Oxford Univ. Press, 2001.
6. Satoh M., Tamura G. et al. // *Virchov Arch*. 1996. V. 427. P. 503–509.
7. Faist E., Schinkel C., Zimmer S. // *World J. Surg*. 1996. V. 20. № 4. P. 454–459.
8. Kirsch A.H., Mahmood A.A., Endres J. et al. // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 1999. V. 13. № 2. P. 80–89.