

РГБ ОД

17 ИЮН 2002

На правах рукописи

Голодных Юрий Викторович

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
РОНКОЛЕЙКИНА® ПРИ ТЯЖЕЛОМ ТЕЧЕНИИ ПНЕВМОНИИ**

14.00.16 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Чита – 2002

Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии ГОУ Читинская государственная медицинская академия.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Ю.А. Витковский

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
кандидат медицинских наук

А.В. Степанов
С.Н. Чабан

Ведущая организация:

ФГУ Омская государственная медицинская академия.

Защита диссертации состоится 22.05 2002 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.118.01 при ГОУ Читинская государственная медицинская академия (672090, г. Чита, ул. Горького, 39-А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ Читинская государственная медицинская академия (672090, г. Чита, ул. Горького, 39-А).

Автореферат разослан 27.04 2002 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук



Ю.Р. Аганова

Р412.301.1-52,0

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время пневмонии продолжают занимать одно из главных мест среди всех видов легочной патологии в стационарах общего профиля. Актуальность проблемы пневмонии определяется не только ее высокой распространенностью, но и серьезностью прогноза. Наиболее часто заболевает пневмонией население молодого возраста и старше 60-и лет (Чучалин А.Г., 1997-2001; Сильвестров В.П., 2001; Синопальников А.И., 1999). Эпидемиология пневмоний на современном этапе характеризуется возникшей с конца 80-х годов тенденцией к росту заболеваемости и летальности как у нас в стране, так и во всем мире (Никонова Е.В., 1997).

Антибактериальная терапия, составляющая основу лечения пневмоний, кроме положительного действия на течение заболевания, нередко оказывает отрицательное влияние на иммунную систему, что связано с повышенным содержанием продуктов метаболизма лекарственных соединений или с побочными явлениями вследствие их биологического действия (Гембицкий Е.В., Новоженев В.Г., 1994; Сильвестров В.П., 2000; Чучалин А.Г., 1995 – 2001).

В связи с этим, в последнее время многими авторами высказывается мнение о введении в комплексное лечение острых воспалительных заболеваний легких иммунокорректирующих препаратов (Козлов В.А., 1999; Потапнев Н.П., 1995). Среди таких средств наиболее привлекательными являются рекомбинантные цитокины. Основная функция цитокинов – передача сигналов между клетками в процессах формирования иммунореактивности. Обладая высоким биологическим действием не только на иммунитет, но и эндокринную и нервную системы, цитокины вовлекаются практически во все жизненные процессы в норме и при развитии заболевания (Симбирцев А.С., 1998). К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют четкие принципы цитокинотерапии и применение цитокинов в качестве лекарственных средств является малоизученной областью медицины. В связи с этим использование цитокиновых препаратов требует строгого обоснования и проведения контроля над предпринимаемым лечением.

Одним из важнейших медиаторов иммунного ответа является ИЛ-2. Он активизирует клональную пролиферацию Т-лимфоцитов, стимулирует клеточную дифференцировку цитотоксических лимфоцитов, клональную пролиферацию В-лимфоцитов, уменьшает спонтанный и активированный апоптоз и др. (Кетлинский С.А, Симбирцев А.С., Воробьева А.А., 1992; Козлов В.К., 2001). Эти обстоятельства позволяют цитокину эффективно

влиять на многие звенья иммунитета при развитии воспалительных заболеваний. Вот почему его применение может оказаться перспективным в комплексном лечении пневмоний, при которых нарушенная иммунореактивность способствует развитию тяжелых осложнений – плеврита, миокардита, деструкции легочной ткани и др. (Сильвестров В.П., 2000; Чучалин А.Г., 1995 – 2001).

В связи с вышесказанным изучение состояния иммунитета при пневмонии, а также внедрение рекомбинантного ИЛ-2 - ронколейкина[®] (БиоТех, СПб) - в терапевтическую практику, разработка показаний для применения препарата и поиски контроля за его использованием является актуальной задачей современной медицины.

Основной **целью** настоящего исследования явилось изучение действия рекомбинантного интерлейкина-2 - ронколейкина[®] - на состояние иммунитета у больных с тяжелым течением пневмонии.

В связи со сказанным нами решались следующие **задачи**:

1. Исследовать состояние клеточного и гуморального иммунитета у больных с осложненным и неосложненным течением пневмонии.
2. Проследить изменение содержания ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α , в плазме больных при развитии тяжелой пневмонии.
3. Изучить влияние ронколейкина на иммунитет, обмен цитокинов, у больных с тяжелым течением пневмонии.
4. Разработать показания для использования ронколейкина у пациентов при пневмонии.

Научная новизна. Впервые установлено, что у больных тяжелой пневмонией на фоне изменений со стороны состава иммунокомпетентных клеток, дисбаланса иммуноглобулинов и гиперпродукции ИЛ-1 α , ИЛ-1 α , ИЛ-8, ФНО α нарушается способность лимфоцитов к адгезии с тромбоцитами.

Впервые для обоснования применения ронколейкина при тяжелой пневмонии использован тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и определены параметры для индивидуального режима его использования.

Показано, что назначение ронколейкина у больных с тяжелым течением пневмонии повышает лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию, снижает содержание ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α .

Практическая ценность работы. Применение ронколейкина у больных пневмонией позволяет улучшить клиническое течение тяжелой пневмонии за счет ускорения регрессии патологических отклонений общего состояния организма, снижает длительность пребывания больных в отделении интенсивной терапии, уменьшает сроки разрешения инфильт-

ации в легких. Проведенные исследования позволили обосновать использование ронколейкина при тяжелой пневмонии. Предложены лабораторно-клинические критерии для курса терапии ронколейкином.

Внедрение в практику. Результаты работы внедрены в лечебную практику 321 ОВКГ, 335 ВГ, и использованы в учебном процессе на кафедрах нормальной физиологии с курсом клинической физиологии, патологической физиологии в Читинской государственной медицинской академии.

Апробация диссертации. Материалы работы представлены на Экспертной научно-практической конференции СибВО (Чита, 1999); Научно-практической конференции ГВКГ им. Н.Н. Бурденко «Актуальные вопросы оказания специализированной пульмонологической помощи» (Москва, 2000); Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 25-летию НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск, 2001).

Положения, выносимые на защиту:

1. У больных с тяжелым течением пневмонии на фоне изменений клеточного и гуморального иммунитета, повышения продукции ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α , нарушается способность лимфоцитов к адгезии с тромбоцитами.
2. Применение рекомбинантного интерлейкина-2 - ронколейкина пациентам с тяжелой формой пневмонии восстанавливает клеточный состав субпопуляции лимфоцитов и увеличивает иммунорегуляторный индекс (CD4+ / CD8+). При комплексном лечении ронколейкином у больных пневмонией в короткие сроки снижается содержание ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α .
3. Использование ронколейкина при комбинированном лечении больных пневмонией усиливает способность лимфоцитов к образованию коагрегатов с тромбоцитами. Тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии позволяет контролировать использование ронколейкина при воспалительном заболевании в легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе со здоровыми людьми и больными пневмонией соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, 2000 ред.).

Нами обследовано 59 больных внебольничной пневмонией мужского пола в возрасте от 18 до 21 лет, находившихся на лечении в 321 ОВКГ.

Больные находились на стационарном обследовании и лечении в терапевтическом отделении 321 окружного клинического военного госпиталя.

В работе использовалась классификация пневмоний, предложенная Н.С.Молчановым (1962) с дополнениями ВНИИ пульмонологии (Коровина О.В., 1978), а также учитывали рекомендации VI Национального Конгресса по болезням органов дыхания (Москва, 1996).

У 29 наблюдаемых больных выявлено одностороннее поражение легкого, у 21 – двухсторонний воспалительный процесс, у 9 – диагностирована крупозная пневмония. При одностороннем поражении легких воспалительный процесс распространялся на несколько сегментов.

Наблюдаемые больные были распределены на пять клинических групп, идентичных по возрасту, полу, стадии, тяжести патологического процесса: 1 группа – контрольная группа с легким течением пневмонии; 2 группа (контроль-1) – больные с тяжелым течением пневмонии; 3 группа (контроль-2) – больные с тяжелым течением пневмонии, получавшие плацебо; 4 группа – больные с тяжелым течением пневмонии, получавшие тималин; 5 группа – больные с тяжелым течением пневмонии, получавшие ронколейкин.

Первую клиническую группу составили больные с односторонним поражением не более одного сегмента легкого без каких-либо осложнений.

У всех пациентов последующих четырех клинических групп пневмония осложнилась дыхательной недостаточностью (ДН), инфекционно-токсическим шоком (ИТШ) и инфекционно-токсической нефропатией (ИТН). На этом фоне у части больных выявлялся плеврит, перикардит, миокардит, а также деструкция легочной ткани. Указанные осложнения носили комплексный характер и значительно ухудшали течение заболевания.

Для оценки эффективности ронколейкина использован метод ДВМ (Double Blind Method), в соответствии с которым выделены две контрольные группы пациентов. В одной из них (2-я группа) проводилось медикаментозное лечение по обычной схеме (25 больных в возрасте от 18 до 22 лет).

Среди пациентов второй контрольной группы (группа 3) применялось плацебо, в качестве которого использовалась внутривенная инфузия физиологического раствора (12 человек того же пола и возраста).

В качестве отдельной группы (группа 4) для исследования лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии наблюдались больные, которым на фоне традиционной терапии применяли известный иммуномодулятор тималин по 10 мг внутримышечно, 1 раз в сутки в течение 5 дней.

Больным опытной группы (группа 5) наряду с традиционным лечением, включающим антибиотикотерапию, дезинтоксикационную терапию, десенсибилизирующую терапию и др. применяли ронколейкин[®]. Препарат назначали в разовой дозе 500000 ЕД в 400 мл 0,9% раствора хлорида натрия, медленно, внутривенно, капельно. Ронколейкин вводили после исследования системы иммунитета под контролем теста лейкоцитарно-тромбоцитарной адгезии.

Полученные данные сравнивались с результатами исследований, проведенных на 120 здоровых донорах в возрасте от 18 до 40 лет.

Методы исследования иммунокомпетентных клеток. Подсчет общего числа лейкоцитов проводили стандартным методом в камере Горяева. Мазки крови фиксировали метанолом в течение 10 мин и окрашивали по Романовскому-Гимза. Подсчет клеток крови осуществляли под иммерсионным объективом $\times 90$, окуляр $\times 15$.

Лейкоцитарный индекс интоксикации вычисляли по формуле:

$$\text{ЛИИ} = \frac{\text{Ми} + \text{Ю} + \text{Пл} + \text{П} + \text{С}}{\text{Э} + \text{Б} + \text{Л} + \text{М}}$$

где: Ми – миелоциты, Ю – юные, Пл – плазматические клетки, П – палочкоядерные, С – сегментоядерные, Э – эозинофилы, Б – базофилы, Л – лимфоциты, М – моноциты.

Выделение иммунокомпетентных клеток. Для получения общего пула лимфоцитов свежую гепаринизированную кровь человека, разбавленную в 2 раза средой 199 наслаивали на урографин-фикол (плотность 1,077) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 минут. После центрифугирования интерфазное кольцо, содержащее лимфоциты, забирали пастеровской пипеткой. Полученную клеточную взвесь трижды отмывали средой 199 и готовили взвесь лимфоцитов нужной концентрации, в зависимости от поставленной цели.

Субпопуляции лимфоцитов определяли методом непрямой поверхностной иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител ТОО «МедБиоСпектр» (Москва) (Барышников А.Ю., 1990).

Определение показателя лейкоцитарно-тромбоцитарной адгезии, относящегося к функциональным тестам оценки иммунокомпетентных клеток, проводили по методу, предложенному Ю.А.Витковским и соавт. (1999). Свежую, гепаринизированную кровь обследуемых больных наслаивали на градиент урографин-фикол (плотность 1,077) и выделяли лимфоциты как описано выше. Собирали интерфазное кольцо, содержащее клетки и кровяные пластинки, однократно промывали фосфатно-солевым буфером (рН

7,4) и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3-4 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали в камере Горяева. Подсчитывали число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток.

Иммуноглобулины классов А, М, G у больных людей определяли методом радиальной иммунодиффузии (Манчини G., 1965). В качестве образца для сравнения использовали стандартные сыворотки с известным содержанием иммуноглобулинов.

Лизосомально-катионный тест (ЛКТ). Мазки крови, приготовленные из скарифицированного пальца руки, высушивали при комнатной температуре и окрашивали по методу В.Е.Пигаревского и соавт. (1981) в 0,1% забуференном спиртовом растворе зеленого прочного с pH 8,2 в течение 20 минут. Дополнительную окраску мазков проводили 0,25% водным раствором азура А. Окрашенные препараты промывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и микроскопировали с использованием масляной иммерсии.

При исследовании просматривали 100 гранулоцитов. Внутриклеточное содержание катионных белков крови оценивали полуколичественно по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК).

Определение концентрации цитокинов. Для определения концентрации цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α) использовали наборы реагентов ТОО "Цитокин" (г. Санкт-Петербург). Измерение уровня цитокинов проводили методом твердофазного ИФА с помощью двойных антител. В качестве стандарта для сравнения в каждой реакции служили рекомбинантные ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α , входящие в состав набора.

Статистическая обработка материала. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных и несвязанных между собой наблюдений и вычислен показатель достоверности различий (Венчиков А.И., Венчиков В.А., 1974).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Состояние иммунитета у больных пневмонией

Нами изучено содержание лейкоцитов, лимфоцитов и их некоторые функциональные показатели у здоровых и больных пневмонией.

Установлено, что у больных пневмонией увеличивается число лейкоцитов по сравнению с показателями здоровых людей. Так у больных пневмонией без осложненного течения оно повышалось до $12,1 \pm 1,3 \times 10^9$ /л, а у пациентов с осложненным течением пневмонии – до $16,6 \pm 1,4 \times 10^9$ /л против $5,8 \pm 0,9 \times 10^9$ /л у здоровых людей ($p < 0,05$).

Общее и относительное количество лимфоцитов у пациентов снижалось в зависимости от степени тяжести патологического процесса. Так, у пациентов с легким течением пневмонии их относительное содержание уменьшалось в 3 раза, с тяжелым течением - в 5 раз, по сравнению со здоровыми людьми ($p < 0,05$). Абсолютные значения числа лимфоцитов снижались до $1,43 \pm 0,2 \times 10^9 / \text{л}$ и $1,1 \pm 0,2 \times 10^9 / \text{л}$ соответственно ($p < 0,01$).

Обнаружено, что у больных на фоне резкого снижения общего количества клеток, уменьшается численность основных субпопуляций лимфоцитов (CD4+, CD8+, CD16+, CD22). Особенно эти нарушения заметны при сравнении абсолютного числа лимфоцитов. Так у больных с легкой степенью заболевания выявлялось $0,72 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$ зрелых Т-лимфоцитов ($p < 0,05$), с тяжелым течением - $0,52 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$), в то время, как у здоровых людей количество этих клеток составляло $1,26 \pm 0,4 \times 10^9 / \text{л}$.

Аналогичное снижение отмечалось среди хелперно-индуцирующих клеток: при легком течении - до $0,72 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$), при тяжелом - до $0,52 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$), по сравнению со здоровыми лицами - $1,26 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$.

Одновременно с этим уменьшалось число цитотоксических (киллерных) лимфоцитов. У пациентов с неосложненным течением патологического процесса оно упало до $0,56 \pm 0,02 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$), а с осложненным - до $0,38 \pm 0,02 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$) против $0,549 \pm 0,05 \times 10^9 / \text{л}$.

Среди субпопуляции естественных киллеров выявлялись подобные изменения, особенно заметные при сопоставлении с абсолютными значениями количества клеток. У больных с легким течением пневмонии количество NK-клеток составляло $0,18 \pm 0,002 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$), с тяжелым - $0,11 \pm 0,001 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,001$), тогда как у здоровых людей показатель находится на уровне $0,284 \pm 0,002 \times 10^9 / \text{л}$.

В результате изменений в составе субпопуляций лимфоцитов у пациентов с тяжелым течением падал иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4+ / CD8+) до $1,3 \pm 0,05$ ($p < 0,05$), в основном за счет более выраженного дефицита Т-хелперов. В то же время у больных с легким течением заболевания иммунорегуляторный показатель находился на уровне здоровых людей - $1,6 \pm 0,05$, что можно объяснить одновременным снижением числа Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов.

На фоне снижения содержания клеток, составляющих Т-популяцию, уменьшалось количество В-лимфоцитов. Так, у пациентов с легкой степенью пневмонии число клеток, несущих маркеры CD22+, составило $0,16 \pm 0,08 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$), что в два раза меньше, чем у здоровых лиц. У больных с тяжелой степенью заболевания количество В-лимфоцитов сни-

зилось до $0,09 \pm 0,07 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$), что в три раза меньше, чем у здоровых людей ($0,319 \pm 0,06 \times 10^9 / \text{л}$).

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что при пневмонии происходит угнетение Т- и В-клеточного звена иммунитета, степень выраженности которого находится в прямой зависимости от степени тяжести заболевания.

Поскольку в последнее десятилетие появились сведения о контактных взаимодействиях тромбоцитов и лейкоцитов, в которых интенсивность коррелирует со сдвигами в иммунной системе и реакцией эндотелиальной стенки сосудов, нами в отдельной серии экспериментов изучена функция лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. (Витковский Ю.А. и соавт., 1999-2002). Установлено, что в норме лимфоциты способны к спонтанному розеткообразованию с тромбоцитами. Доказано, что клетками, взаимодействующими с кровяными пластинками, являются Т-хелперы, а при стимуляции интерлейкином-2 – и НК-клетки (Витковский Ю.А. и соавт., 1999, 2000).

У пациентов с неосложненным течением пневмонии выявлялась повышенная способность лимфоцитов образовывать коагрегаты с тромбоцитами. У них показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) повысился до $28,4 \pm 3,6\%$, в то время как у здоровых лиц этот показатель составлял $14,4 \pm 1,1\%$ ($p < 0,001$).

Однако у больных пневмонией тяжелой степени, при которой наблюдаются различные осложнения, тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии принимает разнонаправленные значения. У одной части больных этот показатель составил $36,7 \pm 3,9\%$ ($p < 0,001$), а у другой – $3,8 \pm 0,8\%$ ($p < 0,001$). Следует отметить, что у больных с тяжелым течением заболевания не обнаруживались средние нормальные значения ЛТА. Среди осложнений у этой группы больных наблюдались плеврит, миокардит, инфекционно-токсический шок, дыхательная недостаточность и др. Почти у всех пациентов эти осложнения имели сочетанный характер. Однако нам не удалось определить закономерности для того или иного сочетания осложнений, при которых выявлялись бы только исходно высокие или только низкие значения ЛТА. Вероятно, обнаруженная разнонаправленность показателей связана со сроками развития заболевания, когда раннее поступление пациентов в стационар сопровождается стимуляцией лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, а позднее – торможением адгезивной активности лимфоцитов. Указанные изменения проявляются на фоне выраженного лейкоцитоза, лимфопении и снижения субпопуляций Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

Таким образом, при пневмонии существенно изменяются адгезивные свойства лимфоцитов, что свидетельствует в одних случаях о стимуляции Т-клеточного звена иммунитета, выражающегося в повышении функциональной активности клеток, а в других - о развитии клеточного иммунодефицита или феномена лейкоцитарной депрессии, который часто сопровождается тяжелое течение заболевания (Витковский Ю.А. и соавт., 1997-1999).

Наряду с изменениями Т-клеточного звена, нами отмечены сдвиги и в гуморальном иммунитете. У больных пневмонией уровень иммуноглобулинов класса А у больных пневмонией выше, чем у здоровых людей. Максимальный подъем концентрации IgA выявлялся при тяжелой степени заболевания и составлял $2,9 \pm 0,4$ г/л, тогда как в контроле он находился на уровне $1,8 \pm 0,2$ г/л ($p < 0,05$). Однако ранними признаками развивающегося воспалительного процесса в легких явилось максимальное повышение уровня IgM, который изменялся пропорционально степени тяжести заболевания ($p < 0,05$). Концентрация IgG у больных пневмонией, по сравнению со здоровыми людьми, не изменялась.

Полученные результаты свидетельствуют о дисбалансе иммуноглобулинов, который можно расценить как проявления относительного гуморального иммунодефицита, который подтверждается снижением содержания В-лимфоцитов.

В патогенезе инфекционных воспалительных заболеваний важная роль принадлежит не только иммунной системе, но и неспецифической резистентности организма. Мы проследили содержание лизосомальных катионных белков в нейтрофилах больных пневмонией (ЛКТ), отражающее кислороднезависимые процессы в фагоцитирующих клетках.

Установлено, что, в нейтрофилах больных пневмонией пропорционально степени тяжести воспалительного процесса существенно снижалось содержание лизосомальных катионных белков. Так, при легком течении пневмонии СЦК составлял $1,2 \pm 0,1$, тогда как в контроле - $1,6 \pm 0,1$ ($p < 0,001$). Развитие осложнений при пневмонии сопровождалось дальнейшим снижением СЦК до $0,8 \pm 0,1$ ($p < 0,001$).

Многочисленными исследованиями показано, что цитокины обеспечивают взаимосвязь и кооперативное взаимодействие между клетками иммунной и фагоцитарной систем (Кетлинский С.А. и соавт., 1992, 1995; Кузник Б.И. и соавт., 1988 – 2001; Витковский Ю.А. и соавт., 1997 – 2001). В связи с этим нами был изучен уровень провоспалительных цитокинов у больных пневмонией.

Как показали исследования, у больных пневмонией повышается содержание всех изучаемых провоспалительных цитокинов. Так, при пнев-

монии, протекающей без каких-либо осложнений, концентрация ИЛ-1 α увеличивается в 5 раз (в опыте - 115 ± 28 , в контроле - $19,3 \pm 4,1$, $p < 0,001$), ИЛ-1 β - в 6 раз (в опыте - 180 ± 30 , в контроле - $32,6 \pm 9,4$, $p < 0,001$), ИЛ-8 - в 5 раз (в опыте - 135 ± 21 , в контроле - $25,9 \pm 4,2$, $p < 0,001$), ФНО α - в 10 раз (в опыте - 115 ± 28 , в контроле - $12,3 \pm 2,1$, $p < 0,001$).

Развитие осложнений у больных пневмонией сопровождалось нарастанием продукции цитокинов. У таких пациентов концентрация ИЛ-1 α поднялась в 8 раз, ИЛ-1 β - в 10 раз, ИЛ-8 - в 14 раз, ФНО α - в 37 раз ($p < 0,001$).

Таким образом, развитие воспалительного процесса в легком сопровождается значительной продукцией цитокинов, что свидетельствует о высокой антигенной стимуляции клеток-продуцентов.

Таким образом, пневмония сопровождается выраженными изменениями со стороны клеточного и гуморального иммунитета, неспецифической резистентности и гиперпродукцией провоспалительных цитокинов. Полученные сведения позволяют говорить о нарушениях не только в составе иммунокомпетентных клеток, но и их функции. Обнаруженные сдвиги в иммунитете у больных пневмонией являются обоснованием для проведения иммунокорректирующей терапии.

2. Использование рекомбинантного ИЛ-2 – ронколейкина – у больных с тяжелым течением пневмонии

В последние годы стала очевидной эффективность использования рекомбинантного ИЛ-2 – ронколейкина[®] (БиоТех, СПб) - в комплексном лечении воспалительных заболеваний. В качестве иммуномодулирующего средства ронколейкин был апробирован в ведущих клиниках Москвы, Санкт-Петербурга при различных воспалительных заболеваниях.

Однако, в настоящее время цитокинотерапия является малоизученным видом лечения, поскольку до сих пор не разработаны принципы контроля над ним.

В нашей работе в качестве контроля использован тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. Это связано с тем, что у пациентов, болеющих пневмонией, нарушены функциональные показатели иммунокомпетентных клеток, что отражается на способности лимфоцитов адгезировать к тромбоцитам. Более того, работами Ю.А.Витковского и соавт. (1999-2001) показано, что интерлейкин-2 повышает адгезивные свойства у Т-хелперов и индуцирует такую способность у натуральных киллеров.

В связи с тем, что исходные показатели теста ЛТА у одних наблюдаемых больных находились на низких значениях, а у других – на высоких,

мы сочли необходимым сгруппировать показатели, исходя из начального уровня ЛТА. Таким образом, каждая группа разделена на две подгруппы.

Оказалось, что после однократного введения ронколейкина у больных пневмонией, не зависимо от исходных показателей, повысилось содержание лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов. Более того, число «розеток» под влиянием ронколейкина у больных с низкими значениями теста заметно превысило аналогичный показатель здоровых людей. В контрольных группах больных пневмонией, включая пациентов, получавших плацебо, у которых выявлялось низкое содержание розеткообразующих клеток, изменений со стороны их адгезивной активности не выявлено. В те же сроки наблюдений у больных с исходно высокими значениями ЛТА отмечалось резкое снижение этой функции клеток.

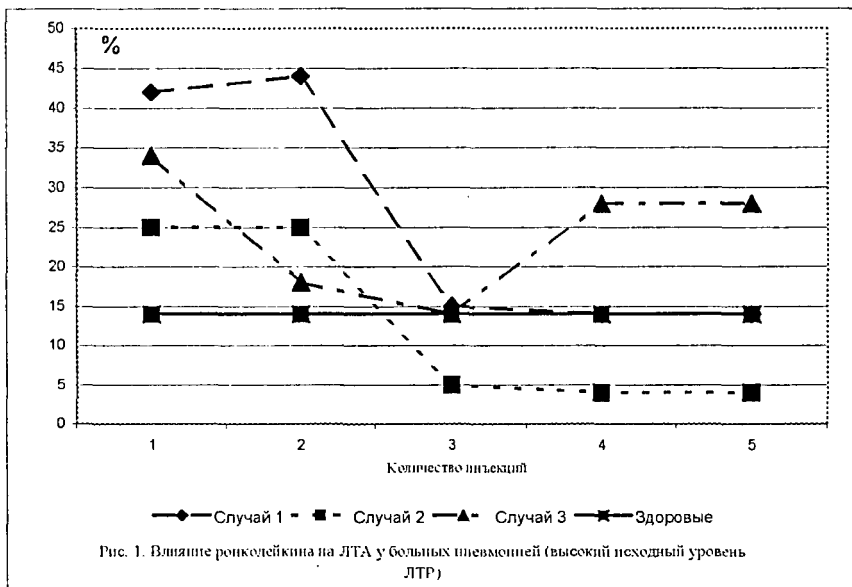
Таким образом, еще раз подтверждено, что рекомбинантный ИЛ-2 – ронколейкин - повышает функциональную активность клеток и кровяных пластинок в части лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии.

Мы использовали тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии для динамического наблюдения больных, получавших ронколейкин. В результате исследований установлено, что изменение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии может служить критерием длительности цитокинотерапии.

Установлено, что повышение количества лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов длится на протяжении определенного времени, после чего следует снижение кривой адгезии. Именно начало снижения числа коагратов явилось сигналом для прекращения введения ронколейкина больным пневмонией. Мы считаем, что в этой точке достигнуто терапевтическое действие препарата и дальнейшее его введение не целесообразно. Это связано с тем, что активация лимфоцитов достигла максимума, после чего наступило понижение экспрессии рецепторов на поверхности клеток и происходит усиленная их миграция в ткани.

На рис. 1 и 2 представлены частные случаи динамического наблюдения лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных пневмонией.

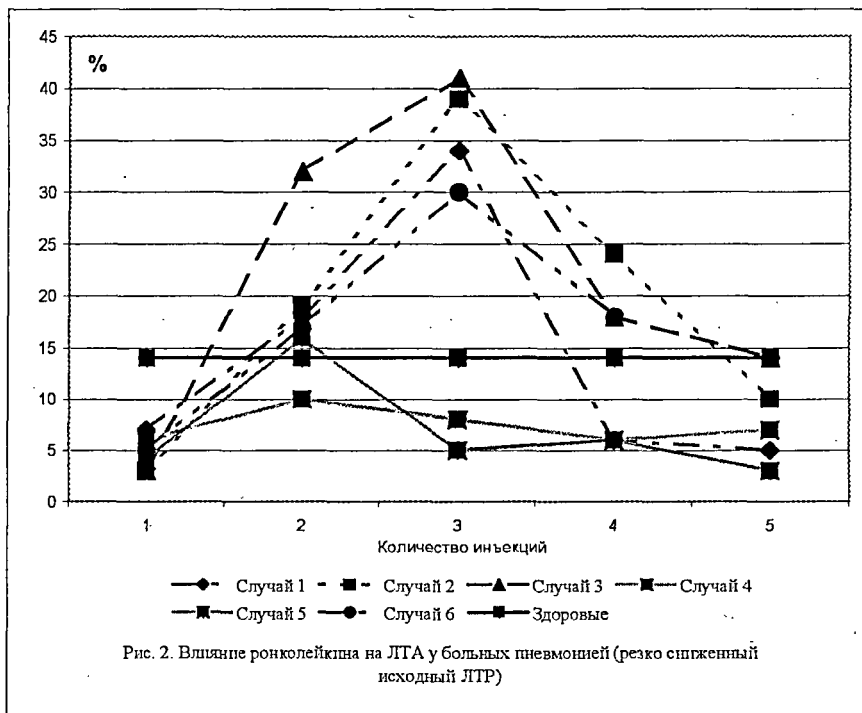
В отдельной серии наблюдений мы сравнили влияние ронколейкина на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию с действием тималина. Оказалось, что во всех случаях после введения тималина у пациентов происходило резкое снижение ЛТА, которое длилось на протяжении пяти дней наблюдения. Таким образом, в графике ЛТА под влиянием тималина отсутствует волна подъема розеткообразующей функции лимфоцитов, что отличает механизм действия полипептидного иммуномодулятора от ронколейкина.



В связи с вышесказанным, мы считаем проведение в динамике теста лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии показательным для индивидуального подбора и лечения цитокинового препарата.

Нами прослежено в динамике влияние ронколейкина на основные клиничко-лабораторные показатели у больных пневмонией. Как оказалось, у больных, получавших ронколейкин общее число лейкоцитов нормализовалось на 5-е сутки, в то время как у больных, находившихся на традиционной схеме лечения лейкоцитоз сохранялся в течение более 10 дней. У больных опытной группы после 5 дней лечения ронколейкином интенсивнее нарастало количество лимфоцитов и в эти сроки полностью нормализовался лейкоцитарный индекс интоксикации. У таких больных к 20-му дню нормализовалась СОЭ, тогда как в контрольной группе этот показатель превышал норму даже на 30-е сутки наблюдения.

Нами проведены исследования клеток иммунной системы у больных на 10-й день заболевания. Наш выбор связан с тем, что в эти сроки происходит переход от острого периода течения заболевания к подострому. Оказалось, что наряду с функциональными показателями, у пациентов всех групп наблюдалась положительная динамика со стороны состава субпопуляций лимфоцитов. Так, общее число лейкоцитов по сравнению с



периодом до лечения с $16,6 \pm 1,4 \times 10^9 / \text{л}$ до $9,78 \pm 0,54 \times 10^9 / \text{л}$ и до $9,38 \pm 0,73 \times 10^9 / \text{л}$, а в случае применения ронколейкина – до $6,9 \pm 0,57 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,001$). Одновременно с этим повышалось количество лимфоцитов от $1,1 \pm 0,2 \times 10^9 / \text{л}$ до $2,15 \pm 0,18 \times 10^9 / \text{л}$ и $1,98 \pm 0,16 \times 10^9 / \text{л}$ в контроле, и до $2,6 \pm 0,14 \times 10^9 / \text{л}$ - в опыте ($p < 0,001$). При этом нарастало количество клеток, несущих маркеры CD3+: от $0,52 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$ до $1,11 \pm 0,08 \times 10^9 / \text{л}$ и $1,05 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$ в контроле, и до $1,62 \pm 0,1 \times 10^9 / \text{л}$ - в опыте ($p < 0,001$). Среди субпопуляций Т-лимфоцитов нарастало число Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических клеток (CD8+). Максимальное увеличение этих клеток выявлялось в группе больных пневмонией, получавших ронколейкин. Изменение состава этих клеток привело к возрастанию иммунорегуляторного индекса от $1,3 \pm 0,05$ до лечения до $1,87 \pm 0,1$ после лечения ронколейкином. Следует отметить, что в обеих контрольных группах иммунорегуляторный индекс находился на таком же уровне, что и в опытной группе больных. Это можно объяснить тем, что возрастание числа Т-клеток с маркерами CD4+ возрастало быстрее, чем CD8+, что в итоге и сказалось

на их отношении.

Со стороны гуморального иммунитета изменения зависели от характера проводимого лечения. Так, содержание В-лимфоцитов повысилось только в группе пациентов, получавших ронколейкин, и составило $15,2 \pm 1,5 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,001$). В то же время у больных контрольных групп число клеток с маркерами CD22+ находилось на уровне $11,2 \pm 2,1 \times 10^9 / \text{л}$ и $10,1 \pm 1,9 \times 10^9 / \text{л}$, что не имело существенных отличий от периода при поступлении ($8,3 \pm 1,5 \times 10^9 / \text{л}$, $p < 0,05$).

На 10-й день заболевания у всех пациентов произошли сдвиги в содержании иммуноглобулинов. Так, во всех группах уменьшилось количество иммуноглобулина М, но сохранилось на высоком уровне количество иммуноглобулина А. Концентрация иммуноглобулина G постепенно нарастала во всех группах, но статистически достоверной оказалась только в группе больных, получавших ронколейкин.

Содержание лизосомальных катионных белков в нейтрофилах больных контрольных групп также не превышала исходные уровни. Однако применение ронколейкина у больных пневмонией существенно увеличило средний цитохимический коэффициент до $1,35 \pm 0,1$ против $0,8 \pm 0,1$ в периоде до лечения ($p < 0,001$).

Несколько иные данные были получены для цитокинов. Оказалось, что к 10-му дню заболевания у пациентов контрольных и опытной группы снижается концентрация ИЛ-1 α и ИЛ-1 β . Наиболее выраженное падение уровня проявлялось для ИЛ-1 α и существенной разницы между контрольными группами и больными, получавшими ронколейкин, не обнаружено. В то же время падение уровня ИЛ-1 β имело разную скорость. Наиболее заметное снижение концентрации этого цитокина обнаружено у больных пневмонией, леченных ронколейкином (с 325 ± 62 пкг/мл до 85 ± 11 пкг/мл, $p < 0,001$). На этом фоне отмечался подъем ИЛ-8 в контрольных группах до 475 ± 45 пкг/мл и до 428 ± 48 пкг/мл (до лечения его концентрация составляла 354 ± 52 пкг/мл. Однако у больных, получавших ронколейкин, показатель уровня ИЛ-8 снижался и составил 205 ± 22 пкг/мл.

Фактор некроза опухолей альфа повторял динамику ИЛ-1. Максимальное снижение концентрации ФНО α наблюдалось в опытной группе пациентов – 128 ± 21 пкг/мл, хотя в контрольных группах также происходило существенное уменьшение концентрации этого цитокина – с 445 ± 62 пкг/мл до 214 ± 46 пкг/мл и 206 ± 51 пкг/мл ($p < 0,001$).

Обнаруженные результаты применения ронколейкина при пневмонии подтверждают, что цитокин способствует более эффективному протеканию механизмов иммунной защиты при болезни, сохранению популяций

T- и В-лимфоцитов, уменьшению продукции эндогенных цитокинов.

Доказательством эффективности такого лечения являются хорошие клинические показатели, указывающие на быстрое разрешение воспаления в легком.

Как показали наши исследования, использование ронколейкина в комплексном лечении больных с тяжелым течением пневмонии приводит к значительному улучшению состояния. При этом быстрее, чем при обычной терапии, исчезали симптомы интоксикации, нормализовалась температура тела, частота дыхания, артериальное давление и показатели общего анализа крови. У пациентов, получавших ронколейкин, быстрее нормализовались данные аускультации легких и раньше проявлялись рентгенологические признаки разрешения патологического процесса по сравнению с больными контрольных групп.

Средняя продолжительность пребывания больных, получавших ронколейкин, в палате интенсивной терапии составляла 2,8 дней, а контрольной группы – 5,2 дней. У них температура тела нормализовалась на 10-е сутки, а в контрольной группе – на 17-20-е сутки, артериальное давление – на 15 сутки (у 75% больных), а в контроле – на 25 сутки (88% больных). Средние сроки разрешения инфильтрации в легких (по данным рентгенологического исследования) для пациентов, получавших ронколейкин – $16,1 \pm 2,8$ дней, а для больных, находившихся на обычной терапии – $30,3 \pm 3,6$ дней.

Таким образом, использование рекомбинантной молекулы интерлейкина-2 (ронколейкина) при лечении пневмонии является патогнетически оправданным видом лечения в сочетании с базисной терапией.

ВЫВОДЫ

1. У больных с тяжелым течением пневмонии развиваются лейкоцитоз и лимфопения, выраженность которых пропорциональна тяжести патологического процесса, снижается количество T-лимфоцитов, несущих маркеры CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ и уменьшается содержание лизосомальных катионных белков в нейтрофилах. Одновременно у больных падает число В-лимфоцитов (CD22+), увеличивается концентрация IgA и IgG. У пациентов при тяжелом течении пневмонии усиливается продукция провоспалительных цитокинов - ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α .
2. У больных пневмонией в первые сутки заболевания лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия повышается, а затем резко снижается.
3. Применение ронколейкина у больных с тяжелым течением пневмонии восстанавливает клеточный состав субпопуляций лимфоцитов, увели-

чивает иммунорегуляторный индекс и значительно снижается содержание ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α .

4. Использование ронколейкина в комплексной терапии больных пневмонией усиливает способность лимфоцитов к образованию коагратов с тромбоцитами. Тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии позволяет контролировать эффективность использования ронколейкина при лечении пневмонии.
5. Применение ронколейкина у больных с тяжелым течением пневмонии приводит к снижению длительности их пребывания в отделении интенсивной терапии и быстрой регрессии патологических отклонений и уменьшает сроки разрешения инфильтрации в легких.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При пневмонии показана цитокинотерапия с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкина) на фоне базисной терапии. Препарат назначают в разовой дозе 500000 ЕД в 400 мл 0,9% раствора хлорида натрия, медленно, внутривенно, капельно. Оптимальный курс включает введение ронколейкина пациентам в первые пять суток заболевания.

Для контроля за лечением ронколейкином рекомендуется проведение в динамике теста лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. Продолжают курс лечения препаратом на протяжении всего периода высокого ответа лимфоцитов на лекарственное средство. Начинаясье снижение ответной реакции служит сигналом к прекращению курса цитокинотерапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Голодных Ю.В., Рамбовский А.И. Вторичные изменения почек при острых пневмониях // Актуальные вопросы клиники, диагностики, лечения и профилактики патологии легких. Тез. научно-практической конференции врачей округа. – Чита. – 1989. – С. 38 – 39.
2. Медус А.И., Яковлев Г.П., Голодных Ю.В., Бреусов В.П. Пневмонии у военнослужащих, классификация, диагностика, лечение и профилактика: Методические рекомендации. – Чита, 1997. – 89 с.
3. Голодных Ю.В., Росин И.В., Войтенко В.Е. Особенности течения пневмоний у военнослужащих в по материалам 321 ОКВГ // Тез. научно-практической конференции ГВКГ им. Н.Н. Бурденко «Актуальные вопросы оказания специализированной пульмонологической помощи». – М., 2000 – С. 5- 6.
4. Голодных Ю.В., Витковский Ю.А., Росин И.В. Особенности состояния

иммунитета и обмена провоспалительных цитокинов у больных пневмонией // Мат. Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 25-летию НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН. - Красноярск, 2001 - С. 233 – 234.

5. Голодных Ю.В. Влияние препарата рекомбинантного интерлейкина-2 (ронколейкина) на состояние иммунитета при тяжелом течении пневмонии // Читинская гос. мед. академия. – Чита. – 2002. – 18 с. – Деп. в ВИНТИ – В2002.
6. Голодных Ю.В. Обмен цитокинов при пневмонии (обзор литературы) // Читинская гос. мед. академия. – Чита. – 2002. – 22 с. – Деп. в ВИНТИ – В2002.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВГ – Военный госпиталь;
ДН – дыхательная недостаточность;
ИЛ – интерлейкин;
ИТШ – инфекционно-токсический шок;
ИТН – инфекционно-токсическая нефропатия;
ИФ – интерферон;
ЛИИ – лейкоцитарный индекс интоксикации;
ЛКТ – лизосомально-катионный тест;
ЛТА – лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия;
ОВКГ – Окружной военный клинический госпиталь;
СЦК – средний цитохимический коэффициент;
ФНО – фактор некроза опухолей;
CD – Cluster of Differentiation (дифференцировочный кластер);
ДВМ – Double Blind Method (двойной слепой метод);
Ig – иммуноглобулин.

Лицензия ИД №03077 от 23.10.00.

Подписано в печать 19.04.02. Бумага офсетная.

Формат 60 x 84 ¹/₁₆. Тираж 100. Заказ №212002.

Отпечатано в информационно-издательском центре ЧГМА
672090, Чита, ул. Горького, 39а.