РГБ ОД
19 СЕН 2007

На правах рукописи

РЕМИЗОВ Дмитрий Васильевич

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ПРИМЕНЕНИЮ ЦИТОКИНОВ В РАННЕЙ ТЕРАПИИ КОМБИНИРОВАННЫХ ПОРАЖЕНИЙ

03.00.16 — Экология
14.00.16 — Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2000

На правах рукописи

РЕМИЗОВ

Дмитрий Васильевич

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ПРИМЕНЕНИЮ ЦИТОКИНОВ В РАННЕЙ ТЕРАПИИ КОМБИНИРОВАННЫХ ПОРАЖЕНИЙ

03.00.16 – Экология
14.00.16 – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2000

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте военной медицины МО РФ

Научный руководитель:
доктор медицинских наук **ЮРКЕВИЧ Ю.В.**

Официальные оппоненты:
Доктор биологических наук **ЧИГАРЕВА И.Г.**
Доктор медицинских наук **КУЗНЕЦОВ С.Н.**

Ведущее учреждение:
I ЦНИИ Министерства обороны РФ

Защита диссертации состоится 08 июня 2000 г. в 13 часов на заседании Диссертационного совета КР 106.05.15 в НИИ военной медицины МО РФ (195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ военной медицины МО РФ.

Автореферат разослан «___» апреля 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук профессор **ЛОПАТИН С.А.**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Резкий рост риска техногенных аварий и катастроф определил в последние годы новое направление в экологии, обобщенное понятием безопасность жизнедеятельности (Довгуша В.В. с соавт., 1995; Агаджанян Н.А. с соавт., 1998). Медико-биологические аспекты обеспечения данного вида экологической безопасности в аварийных условиях предполагают целенаправленное совершенствование средств медицинской помощи, применение которых рассчитано на чрезвычайные ситуации (Куценко С.А., Легеза В.И., 1994; Маник В.М. с соавт., 1994; Дмитриева Т.Б., Гончаров С.Ф., 1998). При этом учитывается высокая вероятность появления в очагах экологических бедствий различных вариантов комбинированных поражений, частота случаев которых может достигать 30 – 75 % (Фурдуй Ф.И. с соавт., 1985; Ерюхин И.А., Алексеев Г.И., 1990; Гончаров С.Ф., 1997). Особо актуальной остается проблема ранней терапии комбинированных радиационных и химических поражений как патологии, присущей техногенным авариям на объектах атомной энергетики и химических предприятиях, а также боевым действиям с применением ядерного и химического оружия (Куценко С.А. с соавт., 1994; Нечаев Э.А., Фаршатов М.Н., 1994; Владимиров В.Г. с соавт., 1997).

Один из путей повышения эффективности раннего лечения комбинированных поражений может быть основан на современных представлениях об адаптационных возможностях системы иммунитета, во многом определяющей уровень резистентности организма, а также механизмах иммунных нарушений при экстремальных воздействиях (Долгушин И.И. с соавт., 1989; Александров В.Н., 1993; Хаитов Р.М. с соавт. 1995). Известно, что патогенез комбинированных радиационных поражений в значительной мере обусловлен недостаточностью механизмов иммунного реагирования (Цыб А.Ф., Бритун А.И., 1989; Bowers G.J., 1997). При этом вклад радиационного компонента комбинированной травмы в иммунодепрессию является, как правило, доминирующим (Будагов Р.С., 1982; Расулев Б.К., 1988; Мамаджанов Т.М., 1992). Выраженное модифицирующее влияние на иммунореактивность организма оказывают высокоток-

сичные вещества, в частности, обладающие алкилирующими свойствами (Сетко Н.Н. с соавт., 1989; Сидоренко Г.И. с соавт., 1989; Сатаров С.Т. с соавт., 1994; Довгуша В.В. с соавт., 1995). Развивающаяся при отравлении ипритом гипоплазия и аплазия лимфоидной ткани и костного мозга приводит к быстрому снижению иммунного статуса, что также может выступать в качестве ведущего фактора отягощения различных патологических состояний (Луйк А.И., 1974; Козяков с соавт., 1994). Однако до настоящего времени закономерности формирования иммунных адаптационных реакций в ранний период комбинированных радиационных и химических поражений изучены недостаточно. На основании имеющихся сведений не представляется возможным оценить значимость нарушений иммунологических сдвигов в патогенезе комбинированных травм, а, следовательно, обосновать принципы патогенетически оправданной иммунокоррекции. Реальный подход к решению этого вопроса открывается на основе использования эндогенных факторов межклеточных взаимодействий (цитокинов) в качестве биологических зондов направленной регуляции гемоиммунопоэза, воспаления, иммунного ответа (Вядро М.М., Навашин С.М., 1989; Рождественский Л.М., 1997; Ярилин А.А., 1997). Применительно к проблеме изучения механизмов иммуносупрессии и путей их коррекции при травматических повреждениях, осложненных проявлениями гематологического синдрома радиационной и химической этиологии, можно предположить, что наиболее перспективными для экспериментальной проработки будут эндогенные иммуномодуляторы интерлейкин-1β и интерлейкин-2. Интерлейкин-1β – ключевой медиатор «цитокиновой сети», важнейший регулятор пролиферации стволовых кроветворных клеток, обладающий выраженным стимулирующим действием на восстановительные процессы кроветворения после облучения, а также химиотерапии (Кетлинский С.А. с соавт., 1992; Dinarello C.A., 1984; Neta R. et al., 1987). Интерлейкин-2 способен замещать хелперную функцию Т-клеток, обеспечивая быстрое нарастание иммунного ответа, что находит подтверждение в исследованиях по коррекции посттравматического иммунодефицита (Пивоварова Л.П., 1999; Kendall A.S., 1993; Tsybin J.N. et al., 1997). В связи

с разработкой отечественных препаратов на основе рекомбинантного интерлейкина-1β (Беталейкин) и интерлейкина-2 (Ронколейкин) такие исследования могут представлять не только научный, но и практический интерес. Аргументированные доказательства целесообразности применения данных цитокинов в ранней терапии комбинированных радиационных и химических поражений отсутствуют.

Цель исследования. Экспериментально изучить закономерности формирования иммунных адаптационных реакций при механической травме, модифицированной действием радиационного и химического факторов, а также патогенетически обосновать подходы к применению интерлейкинов-1 и -2 в ранней терапии комбинированных радиационно-механических и механо-химических поражений.

Задачи исследования:

1. Изучить реакции иммунной системы в ранний период механической травмы, модифицированной острым гамма-облучением, а также отравлением ипритом.

2. Определить особенности иммунорегуляторного действия интерлейкина-1β при механической травме, осложненной проявлениями костно-мозгового синдрома радиационной и химической этиологии.

3. Оценить значимость замещения хелперной функции Т-клеток интерлейкином-2 в ранний период комбинированного радиационно-механического и механо-химического поражений.

Научная новизна и практическая значимость исследования. Получены новые данные о закономерностях изменений адаптационных реакций системы иммунитета в ранний период механической травмы, модифицированной острым радиационным поражением, а также действием алкилирующего агента. Установлено, что гамма-облучение, а также отравление ипритом в дозах, близких к летальным, усиливают иммунную недостаточность, обусловленную механической компрессионной травмой. Отличительными особенностями рассмотренных вариантов комбинированных поражений, предопределяю-

щими неблагоприятный исход, являются развитие иммунодефицита панцитопенического типа с выраженной миелодепрессией, угнетением лимфопоэза, а также подавление Т-клеточноопосредованных и фагоцитарных механизмов резистентности. Доказана патогенетическая значимость иммунных нарушений раннего периода комбинированных травм на уровне Т-хелперов – индукторов клеточного иммунитета. Впервые получены данные о негативном влиянии посттравматической активации продукции фактора некроза опухолей в реализации радиотерапевтического действия интерлейкина-1β. Обоснованы подходы к ранней терапии комбинированных поражений путем замещения хелперной функции Т-лимфоцитов интерлейкином-2.

Впервые определены особенности иммунных нарушений в раннем периоде комбинированных радиационных и химических поражений, что открывает перспективы исследований по разработке терапевтических мероприятий при данной патологии и вносит вклад в общую теорию патогенеза комбинированных поражений. Установлены параметры иммунологической активности интерлейкина-1β и интерлейкина-2 в ранний период механической травмы, модифицированной действием радиационного и химического факторов. Доказана перспективность использования интерлейкина-2 для иммунокоррекции комбинированных радиационно-механических и механо-химических поражений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Угнетение Т-клеточных регуляторных механизмов, а также снижение кроветворной функции костного мозга являются ведущими патогенетическими факторами формирования иммунных расстройств раннего посттравматического периода, осложненного воздействием на организм проникающей радиации и алкилирующего агента.

2. Интерлейкин-1β в радиотерапевтических дозах оказывает негативное влияние на тяжесть проявлений механического компонента комбинированного радиационного и химического поражений, опосредуя усиление продукции фактора некроза опухолей.

3. Коррекция хелперной функции Т-лимфоцитов интерлейкином-2 препятствует развитию дефицита клеточнопосредованного иммунитета, обеспечивая устойчивость организма в ранний период радиационно-механического и механо-химического поражений.

Апробация работы. Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на XIII научной конференции молодых ученых академии (СПб, ВМедА, 1996), III Всероссийском съезде по радиационным исследованиям (М 1997), Всеармейской научной конференции «Актуальные вопросы военно-полевой терапии» (СПб., 1997), Всероссийской конференции «Проблемы противолучевой защиты» (М., 1998), научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины» (СПб, 1998) Материалы диссертации нашли отражение в 6 научных публикациях. Основные результаты исследования реализованы в трех отчетах по плановым темам НИР.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 161 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами, 10 рисунками. Список литературы содержит 215 источников, из них 127 отечественных и 88 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика экспериментального материала. Эксперименты проведены на 988 нелинейных половозрелых белых мышах – самцах и 514 инбредных мышах – самцах линии (CBA ^{x} C $_{57}$ Bl)F1 массой 16,0 – 18,0 г. Животных получали из питомника «Раштолово» (С.-Петербург). В течение двух недель после получения животных выдерживали в карантине.

Моделирование комбинированного радиационно-механического поражения (КРМП). Радиационный компонент КРМП моделировали путем общего однократного гамма-облучения мышей на установке ИГУР-1 в дозах, близких к среднелетальным (6,5 – 6,75 Гр). Мощность дозы составляла

1,3 Гр/мин. Механический компонент КРМП моделировали путем наложения мышам на мягкие ткани задних конечностей зажимов с металлическими пластинками (Кулагин В.К., 1963).) Продолжительность компрессии составляла 1,0 – 1,5 ч, что обеспечивало летальность 30 – 40 % животных. Травма наносилась через 10 – 15 мин после облучения.

Моделирование комбинированного механо-химического поражения осуществляли путем подкожной затравки мышей сернистым иритом в дозах ЛД $_{16}$ – ЛД $_{50}$ (Козяков В.Н. с соавт., 1994) с последующим нанесением компрессионной травмы. Интервал времени между отравлением и механическим воздействием составлял 20 – 30 мин.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 30-сут после воздействия. Тяжесть течения комбинированной травмы оценивали по выживаемости и средней продолжительности жизни подопытных животных.

Методы оценки состояния иммунной системы. Иммунологические исследования включали определение основных характеристик клеточного и гуморального иммунного ответа, функциональной активности фагоцитов, количества клеток лейкоцитарного ряда, концентрации в сыворотке крови провоспалительных цитокинов. Определяли относительную массу тимуса (Антоненко В.Т. с соавт., 1986), степень формирования реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на эритроциты барана (Беляков И.М. с соавт., 1992), число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке по Jerne N.K. и Nordin A.A. (1963), окислительно-восстановительную активность перитонеальных макрофагов (Lokaj J., Oburcova P., 1975), количество лейкоцитов в периферической крови (Неменова Ю.М., 1972), активность фактора некроза опухолей (ФНО-α) в сыворотке крови (Hogan M.M., Vogel S.N., 1988). Исследования проводили через 1 и 3 сут после воздействия.

Препараты цитокинов. В ходе исследования оценивали иммунорегуляторное действие интерлейкина-1β (ИЛ-1β) и интерлейкина-2 (ИЛ-2) человека. Использовали рекомбинантные ИЛ-1β производства ГНИИ ОЧБ (Санкт-Петербург) и ИЛ-2 производства ООО «БИОТЕХ» (Санкт-Петербург). Доза

Таблица 1

Общая характеристика исследований

Задачи исследования	Экспериментальные модели	Исследуемые показатели	Методы исследования	Сроки исследования после воздействия	Количество животных
Изучение реакций иммунной системы в ранний период комбинированных поражений	**Радиационно-механическое поражение** острое гамма-облучение (ЛД $_{40-70/30}$) + механическая компрессионная травма (продолжительность компрессии 1,0 – 1,5 ч)	Число лейкоцитов в периферической крови	Метод подсчета в камере Горяева (Неменова Ю.М., 1972)	1, 3 сут	124
		Весовой индекс тимуса	Определение относительной массы тимуса (Антоненко В.Т. с соавт., 1986)	1, 3 сут	190
Оценка иммуномодулирующего эффекта интерлейкина-1β в ранний период комбинированных поражений		Количество АОК в селезенке при иммунизации эритроцитами барана	Метод локального гемолиза в геле агарозы (Jerne N.K. и Nordin A.A., 1963)	1 сут	150
	Механо-химическое поражение острое отравление ипритом (ЛД $_{16-50/30}$) + механическая компрессионная травма (продолжительность компрессии 1,0 – 1,5 ч)	Интенсивность реакции ГЗТ при иммунизации эритроцитами барана	Определение местной воспалительной реакции (Беляков И.М. с соавт., 1992)	1 сут	90
Оценка иммуномодулирующего эффекта интерлейкина-2 в ранний период комбинированных поражений		Окислительно-восстановительная активность макрофагов	Тетразолиевый метод (Lokaj J., Oburcova P., 1975)	1, 3 сут	114
		Активность ФНО в сыворотке крови	Цитотоксический метод (Hogan M.M., Vogel S.N., 1988)	1, 3 сут	244
		Выживаемость и средняя продолжительность жизни животных	Ежедневный учет гибели животных	В течение 30 сут	590
					Всего: 1502

ИЛ-1β составляла 0,05 мг/кг, ИЛ-2 – 25000 – 250000 МЕ/кг. Цитокины вводили в 0,2 мл изотонического раствора внутрибрюшинно в различные сроки до (72 – 24 ч), а также после (0,5 – 72 ч) воздействия факторов.

Общая схема экспериментов представлена в табл. 1.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. $ЛД_{50}$ токсиканта определяли с помощью пробит-анализа (Беленький М.А., 1963). Для выполнения статистических функций использовали пакет прикладных программ CSS версии 3.1 (Киреев О.В. с соавт., 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Иммунологические реакции в ранний период комбинированных поражений.

Ответная реакция иммунной системы на комбинированное радиационное поражение имела существенные отличия по сравнению с изменениями, возникающими при облучении и механической травме в отдельности (табл. 2).

Нанесение механической травмы одновременно с облучением не приводило к характерному для травмированных животных лейкоцитозу. Количество лейкоцитов в крови через 1 сут после КРМП было значительно снижено ($1,4 \pm 0,12 \cdot 10^9$/л) и соответствовало степени лейкопении у облученных животных. Через 3 сут после КРМП наблюдалось дальнейшее прогрессирование постлучевой лейкопении.

Доминирующее влияние лучевого компонента на иммунологические проявления комбинированной травмы заметно отражалось на состоянии лимфоидного аппарата. Через 1 сут после компрессии мягких тканей снижение относительной массы тимуса по сравнению с контролем составляло 50 % ($p < 0,05$). У мышей, которым наносили травму на фоне облучения, относительная масса тимуса соответствовала значениям, полученных в опытах на животных с «чистым» облучением, и была на 34 % ($p < 0,05$) ниже, чем при изолированном ме-

Таблица 2

Иммунологические сдвиги через 1 сут после комбинированного радиационно-механического поражения у мышей

Показатели	Количество лейкоцитов в крови (10^9/л)	Масса тимуса (весовой индекс)	Количество АОК/селезенку (10^3)	ГЗТ (индекс реакции, %)	НСТ-активность макрофагов (метаболический резерв, %)	ЛПС-индуцированная активность ФНО-α в сыворотке крови (Ед/мл)
Контроль (интактные)	7,5 ± 0,83	0,12 ± 0,01	32,8 ± 5,3	33,6 ± 3,6	50,0 ± 4,2	< 80
Компрессионная травма (1 ч)	11,25 ± 0,6*	0,06 ± 0,004*	14,4 ± 3,9*	21,3 ± 1,7*	11,8 ± 0,9*	5120* (2560÷5120)
Облучение (6,75 Гр)	2,9 ± 0,34*,**	0,04 ± 0,003*,**	2,6 ± 0,8*,**	16,2 ± 1,4*,**	36,6 ± 3,4*,**	160** (80÷160)
КРМП	1,4 ± 0,12*,**	0,04 ± 0,003*,**	1,1 ± 0,4*,**	14,1 ± 1,2*,**	6,4 ± 0,5*,**	5120* (5120÷10240)

Каждая группа состояла из 6 – 10 мышей.

* - различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (интактные);

** - различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой животных, подвергнутых компрессионной травме.

ханическом сдавлении. Аналогичные изменения были установлены спустя 3 сут после КРМП.

Снижение массы тимуса отчетливо коррелировало с депрессией антителогенеза. Степень уменьшения образования АОК в селезенке при иммунизации мышей эритроцитами барана через 1 сут после облучения была значительнее (в 5,5 раза, $p < 0,05$) по сравнению с компрессионной травмой. Комбинированное радиационно-механическое воздействие приводило в этот срок к подавлению иммунного ответа у мышей, как и изолированное облучение.

Наряду с ингибированием гуморального иммунного ответа на тимусзависимый антиген, в ранний период КРМП наблюдались аналогичные сдвиги в реакциях клеточного иммунитета. Комбинированное воздействие механического и радиационного факторов сопровождалось к исходу первых суток угнетением формирования ГЗТ, также сопоставимым с показателями у облученных животных.

Подавлению реакции ГЗТ при КРМП соответствовало более выраженное по сравнению с механической травмой ограничение метаболического потенциала макрофагов.

В то же время, отличия в реакции организма на механическую травму, обусловленные радиационным фактором, не были доминирующими при оценке продукции провоспалительных цитокинов. К исходу первых суток после компрессии мягких тканей в сыворотке крови регистрировался высокий уровень ЛПС-индуцированной активности ФНО. При КРМП концентрация ФНО в системном кровотоке в этот срок соответствовала значениям, установленным у мышей с изолированной компрессионной травмой.

Следовательно, отличительной особенностью патологических изменений раннего периода КРМП является более выраженное по сравнению с механической травмой угнетение инициирующих антителогенез клеточных, в том числе Т-клеточных взаимодействий, обусловленное пострадиационной гипоплазией

костного мозга и тимуса, а также высокая активность цитокин-продуцирующих структур, ответственных за формирование системного воспалительного ответа.

Установленные изменения иммунного реагирования могут иметь отношение к отягощению исходов поражения. Эксперименты показали, что изолированная компрессионная травма сопровождалась гибелью 30 % мышей. Летальные исходы регистрировались в первые 7 сут после сдавления. Комбинация облучения с механической травмой обусловливала в этот период смертность 50 % животных. В последующие сроки летальность мышей с КРМП достигала 70 %.

К аналогичным негативным изменениям в иммунной системе приводила затравка мышей сернистым ипритом. При этом определялся отчетливый дозозависимый характер иммунодепрессивного действия токсиканта. Угнетение иммунного ответа наблюдалось при затравке мышей ипритом в дозе ЛД $_{16}$. В первые 3 сут после его введения продукция АОК была снижена более чем на 30 – 40 % ($p < 0,05$). С увеличением затравочной дозы иприта до ЛД $_{50}$ степень подавления иммунного ответа существенно возрастала. После введения токсиканта в среднелетальной дозе продукция АОК на тимусзависимый антиген снижалась в течение первых 3 сут боле чем на 54 – 80 % ($p < 0,05$), в целом соответствуя результатам, установленным на модели среднелетального радиационного поражения.

Угнетение гуморального иммунного ответа отчетливо коррелировало с динамикой снижения массы тимуса. В условиях отравления ипритом в среднелетальной дозе степень редукции тимуса к исходу 3 сут достигала 70 % ($p < 0,05$).

Следовательно, одним из звеньев патогенеза ипритного отравления является раннее развитие иммунной недостаточности по клеточному и гуморальному типу, что соответствует представлениям о радиомиметическом действии иприта и его производных (Луйк А.И., 1974; Coutlier J.-P.et al., 1990). Есть основания полагать, что установленный характер повреждений в иммунной системе

также будет являться одним из факторов отягощения механической травмы. Действительно, как и на модели КРМП, состояние мышей, подвергнутых механическому сдавлению мягких тканей на фоне затравки ипритом, было значительно тяжелее по сравнению с изолированной травмой. Компрессионная травма в комбинации с отравлением ипритом в дозе ЛД $_{50}$ сопровождалось в первые 7 сут после воздействия повышением летальности с 40 % до 70 %.

Полученные результаты позволяют заключить, что установленные проявления иммунодепрессии радиационной и химической этиологии могут существенно отягощать течение механической травмы. Тем не менее, при очевидном вкладе каждого из механизмов иммунной дисфункции в танатогенез рассматриваемых вариантов комбинированных поражений, представлялось необходимым оценить значимость основных иммунологических нарушений в проявлении синдрома взаимного отягощения. Есть основания полагать, что для решения этой задачи патогенетически оправданным будет использование иммунорегуляторных свойств таких цитокинов, как интерлейкин-1β и интерлейкин-2 (Кетлинский С.А., 1998, 1999; Рождественский Л.М., 1997, 1999; Смирнов М.Н., 1998, 1999).

Иммуномодулирующие эффекты интерлейкина-1β в раннем периоде комбинированных поражений

В условиях изолированного облучения мышей в дозе 6,75 Гр ИЛ-1β обладал как профилактическим, так и лечебным эффектом, что соответствует данным о радиопротективных и радиотерапевтических свойствах данного цитокина (Рогачева С.А., Симбирцев А.С., 1997; Рождественский Л.М., 1997, 1998; Чигарева Н.Г., 1998). Однократная внутрибрюшинная инъекция ИЛ-1β мышам за 24 – 72 ч до облучения повышала выживаемость с 30 % до 60 – 80 %. Оптимальный интервал лечебного применения ИЛ-1β составлял 2 – 6 ч после радиационного воздействия. Эффект цитокина составлял при этом в среднем 30 %. Модифицирующее действие ИЛ-1β при КРМП существенно отличалось от эф

фекта, наблюдаемого у облученных животных. Однократная профилактическая инъекция мышам ИЛ-1β за 24 – 72 ч до воздействия не влияла на устойчивость животных в ранние сроки после КРМП, однако предупреждала гибель 40 - 50 % мышей, в период проявления лучевого компонента КРМП. В контрольной группе к 30 сут наблюдения выживало не более 20 % мышей. В то же время, терапевтическое введение животным ИЛ-1β в дозе, эффективной для раннего лечения острого лучевого поражения, не только не повышало, а, напротив, существенно отягощало течение и исход комбинированной радиационной травмы. Отрицательный прогноз для жизни практически не зависел от сроков применения ИЛ-1β (0,5 – 24 ч). Во всех случаях уже в первые 7 сут после КРМП наблюдалось снижение выживаемости мышей с 50 % до 10 – 20 %. В последующие сроки погибали все оставшиеся животные. Отрицательное действие ИЛ-1β при введении в ранние сроки после КРМП, вероятно, связано с особенностями ответной реакции организма на тяжелое механическое повреждение. Известно, что инициация воспалительных реакций, индуцируемых ИЛ-1, может привести к усугублению посттравматической иммуносупрессии (Сачек М.Г. с соавт., 1994; Пивоварова Л.Н. с соавт., 1996). Эксперименты показали, что использование ИЛ-1β в ранние сроки после механической травмы, как и в случае моделирования КРМП, усиливало летальность мышей с 40 % до 70 – 80 %. На этом основании следует предположить, что ИЛ-1β одновременно с активацией гемоиммунопоэза индуцирует усиление посттравматической острофазовой реакции организма, в том числе секрецию провоспалительных цитокинов, усугубляя характерные для нерадиационного компонента КРП метаболические и сосудистые расстройства (Будагов Р.С., 1992; Ульянова Л.П. с соавт., 1997). Анализ влияния ИЛ-1β на содержание лейкоцитов, а также активность ФНО в периферической крови мышей, подвергнутых компрессионной травме и КРМП, подтвердил это предположение. Было установлено, что в условиях механической травмы, облучения и КРМП ИЛ-1β обеспечивал мобилизацию лейкоцитов в системную циркуляцию (рис. 1).

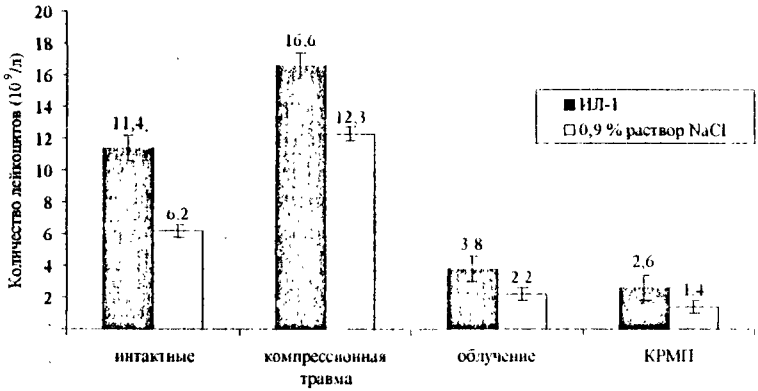

Рис. 1. Влияние интерлейкина-1β на количество лейкоцитов в крови мышей через 1 сут после компрессионной травмы, облучения и КРМП.

В то же время, наряду с проявлением лейкоцитмобилизующих свойств, под влиянием ИЛ-1β наблюдались выраженные изменения активности ФНО. При введении ИЛ-1β через 6 ч после механической травмы и КРМП активность ФНО в сыворотке крови к исходу первых суток достигала значений, более чем в 2 раза ($p < 0,05$) превышающих уровень у пораженных животных, не получавших цитокин (табл. 3).

Таким образом, реализация лейкоцитмобилизующей активности ИЛ-1β в условиях КРМП нивелируется одновременной индукцией провоспалительных цитокинов, что имеет непосредственное отношение к патогенетическим механизмам отягощения рассматриваемого варианта комбинированного поражения. Совершенно очевидно, что, несмотря на радиотерапевтический эффект ИЛ-1β, его применение в качестве средства раннего лечения радиационных поражений в комбинации с механической травмой противопоказано.

Таблица 3

ЦНС-индуцированная активность ФНО в сыворотке крови мышей через 1 ч после компрессионной травмы и КРМП при введении интерлейкина-1β

Варианты опытов	Активность ФНО, Ед/мл	
	Интерлейкин-1β	0,9 % раствор NaCl
Компрессионная травма + облучение	10240 * (5120÷10240)	5120 (2560÷5120)
Компрессионная травма	10240 * (10240÷20480)	5120 (2560÷10240)
Контроль (интактные)	< 80	< 80

В скобках значения доверительного интервала медианы при вероятности 95 %.
*- различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой мышей, получавших в аналогичный срок солевой изотонический раствор.

Данное положение полностью подтвердилось результатами оценки эффективности ИЛ-1β в ранний период компрессионной травмы, осложненной ипритной интоксикацией. Введение цитокина в первые часы после затравки мышей ипритом повышало выживаемость мышей на 20 %, а также увеличивало среднюю продолжительность жизни животных с 5,5 сут до 7,0 сут ($p < 0,05$). Применение ИЛ-1β в ранние сроки после ипритного отравления в комбинации с механической компрессионной травмой, как и в случае его использования на фоне КРМП, сопровождалось усилением гибели животных. Инъекции ИЛ-1β в первые 4 ч после травмы и отравления увеличивали число летальных исходов на 20 – 30 %, а также вдвое сокращали продолжительность жизни погибших мышей.

Полученные результаты позволяют заключить, что коррекция проявлений гематологического синдрома радиационной и химической этиологии интерлейкином-1β в дозах, эффективных для стимуляции восстановления костномозгового кроветворения, отягощает течение раннего периода комбинированной травмы. Одним из патогенетических механизмов, участвующих в развитии жизнеопасных расстройств, является усиление под влиянием ИЛ-1β активности

цитокинов, опосредующих острофазовую реакцию организма на повреждение. Изучение иммуномодулирующих эффектов ИЛ-1β в раннем периоде КРМП и механо-химической травмы свидетельствует о безусловном противопоказании к использованию данного цитокина в схемах раннего лечения комбинированных поражений, сопровождающихся избыточной продукцией провоспалительных цитокинов, в частности, фактора некроза опухолей.

Иммуномодулирующие эффекты интерлейкина-2 в раннем периоде комбинированных поражений

Иные результаты были получены при оценке иммуномодулирующих эффектов ИЛ-2. В условиях среднелетального облучения ИЛ-2 в отличие от ИЛ-1β радиопрофилактическим действием не обладал. Применение ИЛ-2 после облучения также оказалось малоэффективным. Вполне очевидно, что при остром радиационном поражении активация роста Т-клеток является недостаточной для усиления продукции иммунорегуляторных факторов, контролирующих восстановление пула стволовых кроветворных клеток. Вероятно, иммуномодулирующее действие ИЛ-2 будет в наибольшей степени проявляться при патологических состояниях, сопряженных с преимущественным подавлением 1 клеточного звена иммунного реагирования. Как показали эксперименты, двукратная инъекция ИЛ-2 через 0,5 и 4 ч после механической компрессии мягких тканей обеспечивала значительное повышение выживаемости мышей. Степень формирования устойчивости достигала 90 %, что на 40 % выше по сравнению с показателями у травмированных животных, получавших солевой изотонический раствор. Таким образом, применение основного индуктора Т-клеточного иммунитета – интерлейкина-2 в ранний период механической травмы способствует восстановлению функциональной активности Т-лимфоцитов и, в первую очередь, Т-хелперов 1 типа, что находит отражение в ряде работ (Крылов К.М. с соавт., 1997; Пивоварова Л.П., 1999; Rohr F., Tratcher N., 1992). Максимальный эффект ИЛ-2 установлен в дозе, используемой в целях ранней терапии ра

диационного поражения. Можно предположить, что иммуномодулирующие эффекты ИЛ-2 в условиях одновременного воздействия лучевого и механического факторов будут сохранять черты сходства, характерные для адаптационных реакций организма на введение цитокина при изолированных повреждениях, а, следовательно зависеть от периода развития комбинированной травмы. Результаты изучения эффективности ИЛ-2 на модели КРМП подтвердили это предположение. Применение ИЛ-2 в ранний период радиационно-механического поражения, в отличие от ИЛ-1β, приводило к снижению числа летальных исходов. Как и в условиях изолированных воздействий, оптимальные результаты раннего лечения получены при двукратном введении цитокина в первые часы после КРМП. Такое использование ИЛ-2 обеспечивало максимальную устойчивость животных (100 %) в период преобладания механического компонента комбинированного поражения и не оказывало существенного влияния на динамику гибели в период преобладания лучевого компонента. Высокая степень защиты цитокином раннего периода КРМП определяла увеличение выживаемости животных к периоду восстановления.

Таким образом, применение ИЛ-2 обеспечивает реальную возможность улучшения течения и исходов КРМП. Можно предположить, что в ранний период КРМП терапевтический эффект ИЛ-2 реализуется посредством компенсации механизмов, общих по патогенезу с посттравматическими изменениями и мало связаны с коррекцией нарушений, обусловленных радиационным фактором. Как показали эксперименты, в условиях КРМП ИЛ-2 не изменял лейкоцитарную реакцию мышей в первые 3 сут после КРМП и компрессионной травмы. Применение цитокина после механической травмы и КРМП также не отражалось на уровне продукции опухоленекротизирующего фактора. В то же время, ИЛ-2 в значительной степени препятствовал редукции тканевых структур тимуса, угнетению клеточного и гуморального иммунного ответа, а также метаболической активности макрофагов (рис. 2).

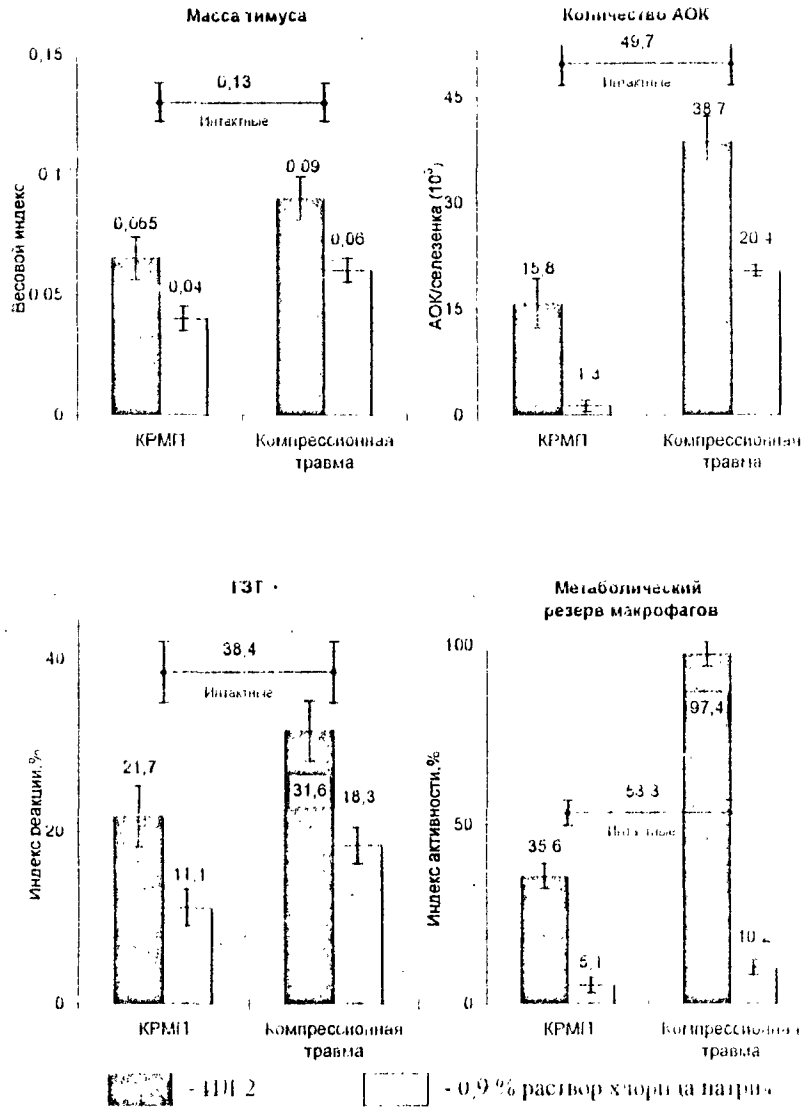

Рис. 2. Иммунологические показатели у мышей в ранний период механической травмы и КРМП при введении интерферона-2

Таким образом, ИЛ-2 проявляет достаточно выраженную иммунологическую активность, тесно коррелирующую с его протективным действием в условиях изолированной и осложненной облучением механической травмы. Несмотря на ограничение механизмов реализации корригирующего действия ИЛ-2 радиационным компонентом КРМП, отличительная особенность его иммуномодулирующих свойств от ИЛ-1β заключается в возможности эффективного использования в схемах раннего лечения радиационно-механических поражений.

Результаты оценки эффективности ИЛ-2 на модели механо-химического поражения подтверждают этот вывод. Введение ИЛ-2 в ранние сроки после затравки ипритом, как и в случае изолированного гамма-облучения, не оказывало выраженного иммуномодулирующего действия, однако, отчетливо повышало устойчивость организма при комбинации ипритного отравления и механической травмы, что свидетельствует о значимости нарушений Т-хелперной активности лимфоцитов в патогенезе механо-химической травмы и целесообразности ее коррекции как вида патогенетической терапии.

В целом, результаты проведенных исследований показывают, что ИЛ-2 восстанавливает иммунную недостаточность, индуцированную комбинированным действием на организм повреждающих факторов механической, лучевой и химической природы. Существенно не изменяя проявления гематологического синдрома, замещение хелперной функции Т-лимфоцитов ИЛ-2 обеспечивает в период преобладания механического компонента комбинированной травмы компенсацию расстройств на уровне клеточных и гуморальных факторов иммунитета, а также метаболической активности макрофагов. Применение ИЛ-2 не сопровождается усилением посттравматической индукции провоспалительных цитокинов, опосредующих острофазовую реакцию организма на повреждение. Это позволяет рассматривать препараты ИЛ-2 в качестве потенциальных средств ранней патогенетической коррекции иммунной недостаточности при

механических травмах, в том числе осложненных иммунодепрессивным действием факторов радиационной и химической этиологии.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально обоснован патогенетический принцип применения цитокинов в ранней терапии комбинированных поражений, вызванных действием на организм комплекса экстремальных экологических факторов.

2. Тяжелая механическая травма, нанесенная непосредственно после воздействия на организм проникающей радиации или отравления алкилирующим агентом (иприт) в дозах, близких к среднелетальным, сопровождается усилением тяжести постгравматических расстройств. В период преобладания проявлений механического компонента комбинированного поражения гибель животных увеличивается на 20-30 %, достигая 50-70 %.

3. Патогенез комбинированной травмы связан с нарушениями в иммунной системе. Иммунологические сдвиги раннего периода комбинированного радиационного (химического) поражения характеризуются угнетением посттравматической лейкоцитарной реакции, значительно более выраженной по сравнению с неосложненной механической травмой редукцией тканевых структур тимуса, подавлением гиперчувствительности замедленного типа и антителообразования на тимусзависимый антиген, ограничением метаболического резерва макрофагов.

4. Предопределяющая значимость иммунных расстройств раннего периода радиационно-механического (механо-химического) поражения принадлежит угнетению межклеточного взаимодействия на уровне Т-хелперов - индукторов клеточного иммунитета, а также снижению кроветворной функции костного мозга.

Компенсация дефицита клеточнопосредованного иммунитета осуществляется путем активации продукции цитокинов, ответственных за формирование системного воспалительного ответа.

5. Коррекция проявлений гематологического синдрома радиационной и имической этиологии интерлейкином-1β в дозах, эффективных для стимуляции восстановления костно-мозгового кроветворения, отягощает течение ранего периода комбинированной травмы. Выживаемость пораженных животных ри введении интерлейкина-1β в первые сутки после воздействия снижается на 0-40 %.

Одним из патогенетических механизмов, участвующих в развитии жизеопасных расстройств, является усиление под влиянием интерлейкина-1β аквности клеточных структур, продуцирующих фактор некроза опухолей.

6. Перспективным способом ранней патогенетической коррекции механических травм, осложненных действием на организм проникающей радиации, также алкилирующих агентов, является замещение хелперной функции Тимфоцитов интерлейкином-2. Существенно не изменяя уровень продукции пухоленекротизирующего фактора и степень выраженности лейкопении, интерлейкин-2 препятствует угнетению клеточного и гуморального иммунитета, а акже моноцитарного механизма защиты, обеспечивая в период преобладания роявлений механического компонента комбинированной травмы устойчивость рганизма к повреждающим факторам.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение препаратов интерлейкина-1β в качестве средств раннего ечения костно-мозгового синдрома радиационной и химической этиологии ротивопоказано в случае комбинации этих поражений с тяжелой механической травмой.

2. Для эффективного восстановления иммунной недостаточности, индуцированной действием на организм комплекса факторов механической, лучевой химической природы, перспективно использование средств на основе интерейкина-2.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ронколейкин в экспериментальной терапии эндотоксикоза при комби нированном радиационно-механическом поражении // Тезисы докладов XII науч. конф. молодых ученых академии. – СПб.: ВМедА, 1996. - С. 63. (соавт Юабова Е.Ю)

2. Корригирующее действие интерлейкина-2 при иммуносупрессии, ин дуцированной ипритом // Фундаментальные и прикладные проблемы совре менной военной токсикологии: Сб. тез. 6-й Всеарм. науч. конф. 24-25 сент. 1996 г. - СПб., 1996. - С. 59 - 60. (соавт. Юркевич Ю.В., Куценко С.А., Сатаров С.Т Сергеев А.А)

3. Изучение характера иммунодепрессивного действия иприта в экспери менте // Фундаментальные и прикладные проблемы современной военной ток сикологии: Сб. тез. 6-й Всеарм. науч. конф 24-25 сент. 1996 г. - СПб., 1996. С. 140 141. (соавт. Юркевич Ю.В., Алексеева И.И., Хромов В Н., Сергеев А А.)

4. Эффективность цитокинов при остром отравлении ипритом в экспери менте // Актуальные вопросы военно-полевой терапии. – СПб.: ВМедА, 1997. - С. 148. (соавт. Юабова Е.Ю. Юркевич Ю.В., Владимирова О.О., Сатаров С.Т. Сергеев А.А.)

5. Резистентность организма к компрессионной травме на фоне радиаци онного поражения // Третий съезд по радиационным исследованиям, Москва 14 - 17 окт. 1997 г.: Тез. докл. - Пущино, 1997. - Т. 1. - С. 84 - 85. (соавт. Юрке вич Ю.В., Юабова Е Ю.)

6. Состояние иммунной системы при комбинированном радиационно механическом поражении // Актуальные проблемы и перспективы развития во енной медицины: - Науч тр. / НИИ воен Медицины - СПб., 1998. - Т. 1 - С 224 – 229 (соавт. Юркевич Ю.В , Юабова Е Ю.)

2000 г. тип. АО «Пластполимер» з.1035 т.100