

УДК 612.017.1;616-006.6

КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ РАССТРОЙСТВ И ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ, ОПЕРИРОВАННЫХ ПО ПОВОДУ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

© *Матвеев Д.А.¹, Ананьев Д.П.¹, Бунятян К.А.², Инвиева Е.В.²,
Винницкий Л.И.², Митрохин С.Д.¹, Калюжин О.В.³*

¹Московская городская онкологическая больница № 62, Москва; ²лаборатория иммунологии и регуляторных механизмов в хирургии Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва; ³кафедра клинической иммунологии и аллергологии Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, Москва

E-mail: kalyuzhin@list.ru

Изучена способность Глимурид (МДП), включающего в качестве активного компонента синтетический аналог бактериального мурамилдипептида, корригировать иммунные расстройства и предотвращать инфекционные послеоперационные осложнения у больных колоректальным раком. Периоперационный прием МДП препятствовал снижению общего числа лимфоцитов, а также CD3+ и CD3+CD4+-клеток в периферической крови в раннем послеоперационном периоде. В позднем послеоперационном периоде у больных, получавших МДП, число CD3+, CD3+CD4+ и CD3+CD8+-клеток в крови и фагоцитарная активность нейтрофилов были выше, чем в контрольной группе. Выявлена выраженная тенденция МДП к предотвращению развития послеоперационных инфекционных осложнений. Нежелательные явления, связанные с приемом иммуномодулятора, не обнаружены.

Ключевые слова: колоректальный рак, мурамилдипептид, глимурид, послеоперационные инфекционные осложнения, иммунные расстройства.

CORRECTION OF IMMUNE DISORDERS AND PREVENTION OF INFECTIOUS COMPLICATIONS IN PATIENTS OPERATED ON FOR COLORECTAL CANCER

Matveev D.A.¹, Ananiev D.P.¹, Bunyatyan K.A.², Inviyaeva E.V.², Vinnitsky L.I.², Mitrokhin S.D.¹, Kalyuzhin O.V.³

¹City Clinical Oncological Hospital No. 62, Moscow; ²Laboratory of Immunology and Regulatory Mechanisms in Surgery of Academician B.V. Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery, Moscow; ³Department of Clinical Immunology and Allergy of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

The ability of Glymurid (MDP), which contains synthetic analogue of bacterial muramyl dipeptide as an active ingredient, to correct immune disorders and prevent postoperative infectious complications has been studied in patients with colorectal cancer. Perioperative use of MDP prevented the decrease in total lymphocyte number, as well as CD3+ and CD3+CD4+ cell count in peripheral blood in the early postoperative period. In the late postoperative period, the number of CD3+, CD3+CD4+, and CD3+CD8+ cells in the blood and phagocytic activity of neutrophils were higher in the patients who took MDP in comparison with the control group. The marked tendency of MDP to prevent postoperative infectious complications was revealed. Adverse effects associated with the administration of the immunomodulator were not found.

Keywords: colorectal cancer, muramyl dipeptide, Glymurid, postoperative infectious complications, immune disorders.

Колоректальный рак (КРР) является второй из наиболее часто диагностируемых форм неопластических заболеваний и второй наиболее распространенной причиной онкологической смертности в США [19], Европе [13], России и странах СНГ [1, 2]. К сожалению, технический прогресс в диагностике и хирургическом лечении гастроинтестинальных опухолей, достигнутый в последние 2-3 десятилетия, практически не изменил уровня выживаемости больных КРР, который имеет лишь незначительный восходящий тренд. При этом соотношение регистрируемых показателей смертности и заболеваемости остается высокой и составляет в Европе 0.4-0.44 [22]. Вместе с тем КРР потенциально излечим при раннем обнаружении до развития метастазов: после хирургической резекции опухоли, локализованной в толстой или прямой кишке (стадия А по класси-

фикации G. Duke), 5-летняя выживаемость превышает 90%. Наоборот, больные с КРР стадии D, когда опухоль уже распространилась на другие органы, имеют 5-летнюю выживаемость менее 10% [20].

Летальность вследствие осложнений хирургических вмешательств по поводу КРР достаточно высока даже в наиболее развитых странах мира (3-10%) и зависит от стадии заболевания, локализации опухоли, возраста больного, коморбидного фона, а также экстренности, типа и продолжительности операции [12, 16, 17, 21]. Одной из важнейших причин послеоперационных осложнений является недостаточность противoinфекционной защиты, развивающаяся в результате иммуносупрессивного действия как самой опухоли, так и проводимого лечения, в том числе хирургического вмешательства.

Описана способность мурамилдипептида – низкомолекулярного гликопептидного компонента бактериального пептидогликана – и его производных усиливать противоинфекционную и противоопухолевую защиту [3-8]. Мурамилпептиды, образуемые в результате распада индигенных и контаминирующих пищевые продукты бактерий, постоянно циркулируют в организме человека как естественные модуляторы иммунных реакций. Эта группа иммуномодуляторов характеризуется детально изученными молекулярными механизмами действия, включающими агонизм NOD2-рецепторов врожденного иммунитета. Принципиальная целесообразность применения мурамилпептидов при опухолевых заболеваниях доказана как в зарубежных [14], так и в российских исследованиях [9]. Вместе с тем оставалась неизученной возможность использования мурамилдипептидсодержащей биологически активной добавки к пище Глимурида (далее в тексте – МДП) для предотвращения/коррекции иммунных расстройств и профилактики инфекционных осложнений у оперированных больных КРР, что и явилось целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МДП предоставлен ООО «Кристалл-Мед» (Москва) в упаковках по 20 капсул, содержащих по 0,1 мг мурамилдипептида.

Исследование проведено на базе Московской городской онкологической больницы № 62 Департамента здравоохранения города Москвы.

Оценка эффективности МДП проводилась как открытое рандомизированное клиническое испытание у больных КРР в возрасте от 40 до 69 лет, оперированных по поводу рака толстой и прямой кишки (T1-4N0-2M0-1, стадии I-IV; в 1 случае – TisN0M0, рак *in situ*; у большинства больных – T3-4N0-2M0, стадии II-III). Подготовка больных к операции, оперативные вмешательства и ведение пациентов в послеоперационном периоде осуществлялись в соответствии с существующими стандартами.

Всем больным с профилактической целью внутривенно вводили цефазолин (2,0 г – за 40 мин до операции; 2,0 г – через 4 часа после ее окончания).

Больные подразделены методом случайной выборки на группы:

1. Контрольная группа (25 человек) – стандартное ведение больного.

2. Тест-группа (18 человек) – стандартное ведение больного, дополненное приемом МДП по 2 капсулы ежедневно в течение 5 суток до операции и по 2 капсулы через день в течение 30 суток

после нее, начиная с 5-го дня после хирургического вмешательства.

В период проведения исследования и в течение 3 месяцев до его начала другие иммуностропные препараты не применялись.

Основными критериям эффективности МДП являлись отсутствие послеоперационных инфекционных осложнений на протяжении 1 месяца после операции и предотвращение/коррекция вызванных заболеванием и его лечением иммунных расстройств.

Образцы крови для иммунологических исследований отбирали при поступлении (10-5-е сутки до операции), затем на 3-5-е и 30-35-е сутки после хирургического вмешательства.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной лазерной цитометрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, США) с использованием двухцветного реагента Simultest (флуоресцеин-изотиоцианат, фикоэритрин) (Becton Dickinson, США).

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по их способности поглощать клетки *Staphylococcus aureus*, меченные флуоресцеин-изотиоцианатом, на проточном цитометре FACScan.

Результаты обрабатывали математически согласно общепринятым методам [10] с помощью программы STATISTICA 8 (StatSoft, Inc.). Значимость различий выборок по категориальным показателям оценивали с применением критерия χ^2 с поправкой Йетса и точного критерия Фишера. Для сравнения выборок по количественным переменным, которые представляли в виде средней \pm стандартное отклонение, использовали либо *t*-критерий Стьюдента при нормальном распределении показателей, либо критерии Манна-Уитни и Вилкоксона для несвязанных и связанных выборок при распределениях, отличных от нормального. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Больные КРР хорошо переносили прием МДП: в тест-группе не отмечено ни одного случая развития нежелательных побочных явлений, которые могли быть связанными с применением этого иммуномодулятора.

Исходно у подавляющего большинства пациентов, включенных в исследование, среднее абсолютное и относительное содержание лимфоцитов, а также их основных субпопуляций в периферической крови было в пределах референсного диапазона, условно принятого за норму (табл. 1).

Таблица 1

Влияние МДП на динамику иммунологических показателей периферической крови больных колоректальным раком

Показатель	При поступлении		Ранний послеоперационный период		Поздний послеоперационный период		Референсные значения (норма)
	Контроль	МДП	Контроль	МДП	Контроль	МДП	
Лимфоциты: % × 10 ⁶ клеток/мл	28±9 2.10±0.68	25±7 2.05±0.58	14±4‡ 1.22±0.35‡	20±7* 1.62±0.57*	21±6‡ 1.65±0.46	24±6 1.93±0.45	19–37 1.2–3.4
CD3 ⁺ -клетки: % × 10 ⁶ клеток/мл	73±9 1.54±0.20	76±9 1.55±0.18	65±8‡ 0.79±0.10‡	73±8* 1.18±0.13*‡	67±7 1.10±0.11‡	74±9 1.43±0.17*	66–82 0.8–2.2
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки: % × 10 ⁶ клеток/мл	46±5 0.97±0.10	49±7 1.00±0.14	44±7 0.55±0.08‡	55±8* 0.89±0.13*‡	46±6 0.78±0.12‡	51±6 0.98±0.11*	38–52 0.6–1.6
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки: % × 10 ⁶ клеток/мл	23±4 0.49±0.08	23±5 0.48±0.11	19±5‡ 0.23±0.06‡	15±5‡ 0.24±0.08‡	17±4‡ 0.28±0.07‡	19±5 0.37±0.10*‡	17–33 0.19– 0.65
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ - клетки: % × 10 ⁶ клеток/мл	14±6 0.29±0.13	12±4 0.24±0.10	17±5 0.21±0.06‡	14±5 0.23±0.08	14±4 0.23±0.07	13±6 0.25±0.12	8–20 0.12– 0.45
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ - клетки: % × 10 ⁶ клеток/мл	3.1±1.1 0.065±0.023	3.0±1.3 0.062±0.027	2.6±0.8 0.032±0.01‡	2.9±1.1 0.047±0.018*	2.6±1.2 0.043±0.02‡	2.5±1.2 0.048±0.023	<10 <0.2
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ : отн. ед.	2.0±0.4	2.1±0.6	2.4±0.6‡	3.7±0.9*‡	2.8±1.0‡	2.6±0.8	1.1–2.5
Фагоцитарная активность нейтрофилов: %	83±6	85±7	78±7	81±8	79±5	85±5*	80–90

Примечание: * – $p < 0.05$ в сравнении с контролем; ‡ – $p < 0.05$ в сравнении с показателями при поступлении.

В контрольной группе на 3-5-е сутки после операции абсолютное и относительное число лимфоцитов снижалось с дооперационного уровня примерно вдвое: среднее абсолютное количество падало до нижней границы нормы, а относительное – ниже этой границы. В группе пациентов, получавших МДП, отмечена лишь тенденция к снижению содержания лимфоцитов, при этом абсолютное и относительное число этих клеток было выше, чем в контроле.

Через 30-35 суток после операции и в контроле, и у больных, получавших МДП, отмечали увеличение относительного и абсолютного числа лимфоцитов, однако в контрольной группе их относительное количество оставалось на более низком уровне, чем при поступлении в стационар. В позднем послеоперационном периоде математически подтвержденных различий содержания лимфоцитов между группами не выявлено, однако была заметна тенденция МДП к увеличению количества этих клеток как в абсолютных, так и в относительных единицах измерения.

Динамика уровня CD3⁺-клеток (Т-лимфоцитов) в периферической крови после резекции опухоли подчинялась в обеих группах тем же закономерностям, что и общее содержание лимфоцитов. Прием МДП сокращал степень па-

дения абсолютного числа CD3⁺-клеток в раннем послеоперационном периоде с 49% до 24%. В позднем послеоперационном периоде иммуномодулятор способствовал полному восстановлению содержания Т-лимфоцитов, тогда как в контрольной группе абсолютное количество этих клеток было ниже исходного уровня.

В группе со стандартным периоперационным введением больных на 3-5-е сутки после хирургического вмешательства наблюдалось падение содержания CD3⁺CD4⁺-клеток (хелперно-регуляторной субпопуляции Т-лимфоцитов), наиболее выраженное в абсолютном измерении (-43%). МДП минимизировал степень снижения абсолютного количества этих клеток (-11%), сохраняя его в референсном диапазоне нормы, и даже несколько увеличивал относительное содержание Т-хелперов/регуляторов. Через 30-35 суток после операции в контроле содержание CD3⁺CD4⁺-клеток возрастало, но оставалось на более низком уровне, чем при госпитализации. У больных, принимавших МДП, этот показатель восстанавливался до исходных значений.

Относительное и абсолютное содержание CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов (цитотоксических Т-лимфоцитов) в периферической крови больных контрольной и тест-групп уменьшалось в раннем

Влияние МДП на частоту развития послеоперационных инфекционных осложнений у больных колоректальным раком

Послеоперационные инфекционные осложнения	Контрольная группа (n=25)	Тест-группа (МДП) (n=18)	Достоверность различия между группами (p)	
			Критерий χ^2 с поправкой Йетса	Точный критерий Фишера
Общее число	9 (36%)	3 (17%)	0.147	0.147
Инфекции области хирургического вмешательства	4 (16%)	2 (11%)	0.496	0.503
Пневмония	4 (16%)	1 (6%)	0.284	0.292
Инфекции мочевых путей	1 (4%)	0	0.434	0.581

послеоперационном периоде примерно в равной степени. В позднем послеоперационном периоде в обеих группах наблюдали восходящий тренд абсолютного числа этих клеток, более выраженный на фоне курсового приема МДП. В результате через 1 месяц после резекции опухоли количество $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов в тест-группе пре-восходило таковое в контроле.

У пациентов контрольной группы на 3-5-е сутки после хирургического вмешательства абсолютное количество $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток (естественных киллеров, НК) существенно снижалось, тогда как в тест-группе оно практически не изменялось. При этом в обеих группах выявлена тенденция к росту относительного числа НК-клеток. Через 30-35 суток абсолютное число $CD3^+CD16^+CD56^+$ -лимфоцитов возрастало у большинства пациентов, однако прием МДП обеспечивал более полное восстановление этого показателя. Относительное количество НК-клеток возвращалось к дооперационным значениям практически у всех больных вне зависимости от применения иммуномодулятора.

В контрольной группе абсолютное число $CD3^+CD16^+CD56^+$ -лимфоцитов (естественных киллерных Т-клеток, НКТ) в раннем послеоперационном периоде снижалось вдвое, тогда как у пациентов, получавших МДП, наблюдалась лишь тенденция к падению количества этой субпопуляции лимфоцитов. В позднем послеоперационном периоде содержание НКТ-клеток не различалось между группами как в абсолютных, так и в относительных единицах, однако только в контрольной группе абсолютное число этих лимфоцитов было ниже такового при поступлении.

Через 3-5 дней после резекции опухоли у большинства больных отмечали тенденцию к снижению фагоцитарной активности нейтрофилов, при этом в контрольной группе этот показатель выходил за нижнюю границу диапазона нормальных значений. Через 1 месяц после хирургического вмешательства в группе со стандартным периоперационным ведением пациентов фагоцитарная активность оставалась на уровне

раннего послеоперационного периода. На фоне курсового приема иммуномодулятора происходила полная нормализация функции нейтрофилов.

У пациентов контрольной группы послеоперационные инфекционные осложнения возникали в 36% случаев; основными их видами были инфекция области хирургического вмешательства и пневмония (табл. 2). У больных, принимавших МДП, частота всех инфекционных осложнений была вдвое ниже, при этом наиболее выраженным был тренд по снижению числа пневмоний. Однако из-за ограниченного количества больных, участвовавших в исследовании, а также вследствие относительно невысокой частоты развития послеоперационных инфекций в контроле, указанные различия между группами не достигали уровня статистической значимости.

Таким образом, МДП существенно снижал степень падения числа лимфоцитов, $CD3^+$ -, $CD3^+CD4^+$ - и $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток в периферической крови на 3-5-е сутки после резекции опухоли, а в позднем послеоперационном периоде обуславливал более полное восстановление этих показателей, а также количества $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов. Очевидно, вышеуказанные иммуотропные эффекты МДП преопределили выраженную тенденцию к снижению частоты развития послеоперационных инфекционных осложнений.

В задачи исследования не входила оценка потенциальной противоопухолевой активности иммуномодулятора. Однако, учитывая прогностическую значимость иммунологических показателей у оперированных больных с опухолями желудочно-кишечного тракта [15, 18], выявленные изменения лабораторных индикаторов клеточного иммунитета под влиянием МДП внушают оптимизм в плане судьбы пациентов в отношении основного заболевания.

Полученные данные, наряду с результатами ряда других клинических исследований и многочисленных экспериментальных работ [3-8, 11], подтверждают выраженную иммуотропную активность МДП и говорят о его высокой эффек-

тивности в коррекции иммунных расстройств у больных, оперированных по поводу КРР. Представляются целесообразными и весьма перспективными дальнейшие испытания этого иммуномодулятора как средства предотвращения инфекционных осложнений и стимулятора противоопухолевого ответа у данной категории больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2009 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т. 22. – № 3 (Прил. 1). – С. 54-92.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2009 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т. 22. – № 3 (Прил. 1). – С. 93-123.
3. Калюжин О.В. Производные мурамилдипептида в эксперименте и клинике // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1998. – № 1. – С. 104-108.
4. Калюжин О.В. Иммуномодулирующая активность гликозидных производных N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина // Вестник новых медицинских технологий. – 2003. – № 1-2. – С. 28-32.
5. Калюжин О.В., Баитаненко А.Ф., Шкалев М.В., Нелюбов М.В., Ковалевская Е.О., Абидов М.Т. Иммуномодуляторы-мурамилпептиды: от экспериментов к клинике // Якутский медицинский журнал. – 2004. – № 4 (8). – С. 56-60.
6. Караулов А.В., Калюжин О.В., Земляков А.Е. Биологическая активность гликозидных производных N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – № 1. – С. 14-24.
7. Караулов А.В., Калюжин О.В. Иммуноterapia инфекционных болезней: проблемы и перспективы // Терапевтический архив. – 2013. – Т. 85. – № 11. – С. 100-108.
8. Караулов А.В., Калюжин О.В. Сфера применения мурамилпептидов в рамках основных подходов к иммунотерапии/иммунопрофилактике инфекционных болезней // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17. – № 5. – С. 3-15.
9. Липоид в онкологии. Сборник научных статей. – М. : Пептек, 2008. – 80 с. – Режим доступа: http://www.lipoid.ru/sites/default/files/lipoid_v_onko_14.pdf, свободный (17.05.2014).
10. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 304 с.
11. Chikako O., Liua Y.-J., Kobayashia K.S. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy // Curr. Bioact. Compd. – 2011. – Vol. 7, N 3. – P. 180-197. doi:10.2174/1573407117.
12. Dimick J.B., Cowan J.A. Jr., Upchurch G.R. Jr., Colletti L.M. Hospital volume and surgical outcomes for elderly patients with colorectal cancer in the United States // J. Surg. Res. – 2003. – Vol. 114, N 1. – P. 50-56.
13. Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W., Comber H., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012 // Eur. J. Cancer. – 2013. Vol. 49, N 6. – P. 1374-1403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
14. Meyers P.A., Chou A.J. Muramyl tripeptide-phosphatidyl ethanolamine encapsulated in liposomes (L-MTP-PE) in the treatment of osteosarcoma // Adv. Exp. Med. Biol. – 2014. – Vol. 804. – P. 307-321. doi: 10.1007/978-3-319-04843-7_17.
15. Milasiene V., Stratilatovas E., Norkiene V. The importance of T-lymphocyte subsets on overall survival of colorectal and gastric cancer patients // Medicina (Kaunas). – 2007. – Vol. 43, N 7. – P. 548-554.
16. Morris E.J., Taylor E.F., Thomas J.D., Quirke P., Finan P.J., Coleman M.P., Rachet B., Forman D. Thirty-day postoperative mortality after colorectal cancer surgery in England // Gut. – 2011. – Vol. 60 (6). – P. 806-813.
17. Patel S., Lutz J.M., Panchagnula U., Bansal S. Anesthesia and perioperative management of colorectal surgical patients – specific issues (part 2) // J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. – 2012. – Vol. 28, N 3. – P. 304-313.
18. Qiu H., Xiao-Jun W., Zhi-Wei Z., Gong C., Guo-Qiang W., Li-Yi Z., Yuan-Fang L., Rajiv-Prasad K. The prognostic significance of peripheral T-lymphocyte subsets and natural killer cells in patients with colorectal cancer // Hepatogastroenterology. – 2009. – Vol. 56, N 94-95. – P. 1310-1315.
19. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. Cancer statistics, 2014 // CA Cancer J. Clin. – 2014. – Vol. 64, N 1. – P. 9-29. doi: 10.3322/caac.21208.
20. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2013 // CA Cancer J. Clin. – 2013. – Vol. 63, N 1. – P. 11-30. doi: 10.3322/caac.21166.
21. Sjo O.H., Larsen S., Lunde O.C., Nesbakken A. Short term outcome after emergency and elective surgery for colon cancer // Colorectal Dis. – 2009. – Vol. 11, N 7. – P. 733-739.
22. Zavoral M., Suchanek S., Majek O., Fric P., Minarikova P., Minarik M., Seifert B., Dusek L. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress // World J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, N 14. – P. 3825-3834. doi: 10.3748/wjg.v20.i14.3825.