

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

А.В. Наумов^{1,2}, А.М. Мануйлов²

¹Краснодарская клиническая больница
скорой медицинской помощи

²Кубанский государственный медицинский
университет, Краснодар

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

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

Препаратом с возможными как системными, так и местными (интраперитонеальным) иммунокорреги-

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

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

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

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

Материалы и методы

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

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

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

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

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

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

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

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

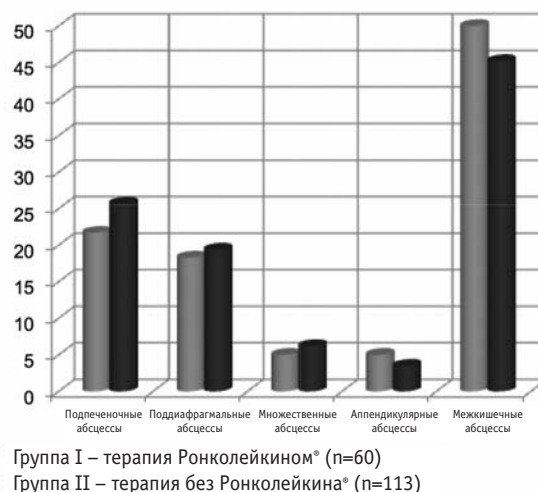
Результаты исследования

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

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

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

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



тропного лечения также обнаружило достоверные различия в секреции цитокина ($t=2,3$, т. е. $p < 0,05$), однако различия между группами II и группой сравнения находились за границами доверительной вероятности « p » и расценивались нами как тенденция ($t=1,7$, т. е. $p < 0,1$).

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

Концентрация цитокинов в сыровотке крови больных с ОГВЖС в процессе мониторинга (M $\pm$ m)

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

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

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

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

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

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

Обсуждение результатов

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

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

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

Литература

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: 2008; 552.
2. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции. Цитокины и воспаление. 2004; 3: 2: 16–23.
3. Смирнов М.Н., Гринев М.В., Громов М.И., Тарелкина М.Н., Пивоварова Л.П., Широков Д.М., Разумова Н.К. Цитокиновая терапия хирургического сепсиса Ронколейкином®. Тезисы докладов V Российского национального конгресса «Человек и лекарство». М.: 1998; 197.
4. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: 2000; 432.
5. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: 1999; 608.
6. Мясников А.Н., Смирнов М.Н., Авот А.Я., Грен Э.Я. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК рJDB (MSIL), обеспечивающая синтез интерлейкина-2 человека в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способ ее получения и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – продуцент интерлейкина-2 человека. Патент SU № 1770359 Дата приоритета 24.03.92.
7. Смирнов М.Н., Хромов-Борисов Н.Н. Ронколейкин® – интерлейкин-2 человека рекомбинантный дрожжевой: производство и клинические испытания. Материалы II-й международной конференции «СПИД, рак и родственные проблемы». СПб.: 1995; 77.
8. Козлов В.К. Иммунопатогенез и цитокиноterapia хирургического сепсиса. Вестник РВМА. 2002; 2 (8): 12–22.
9. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммунотерапевтических воздействий при лечении сепсиса. Медицинская иммунология. 2001; 3: 3: 415–429.
10. Козлов В.К. Дисфункция иммунной системы в патогенезе сепсиса: возможности диагностики. Цитокины и воспаление. 2006; 5: 2: 15–29.
11. Анисимов А.Ю. Иммунотерапия Ронколейкином® в комплексном лечении больных абдоминальным сепсисом. Пособие для врачей. Казань, 2004; 28.
12. Костюченко А.Л. Ронколейкин®: иммунокоррекция в лечении сепсиса. СПб.: 2000; 11.
13. Лазанович В.А., Смирнов Г.А., Маркелова Е.В., Силич Е.В., Семехин А.И., Корявченкова И.В. Ронколейкин® в лечении септических больных. Медицинская иммунология. 2000; 2: 2: 224.
14. Рожков А.С., Лебедев В.Ф., Кобиашвили М.Г. Сепсис. Избранные вопросы терапии инфекционных больных. Руководство для врачей. СПб.: 2005; 855–878.
15. Останин А.А. Иммунопатогенетические аспекты и цитокино-терапия хирургических инфекций. Автореф. дисс. на соиск. ученой степени докт. мед. наук. СПб.: 1999; 44.