

Иммунологическая оценка эффективности применения Ронколейкина в кардиохирургии при лечении инфекционного эндокардита

М.А. Алиев¹, Н.Н. Беляев², К.Б. Абзалиев¹, Н.С. Сериков¹, А.Ю. Богданов²,
Ф.Г. Саввулиди², Р.Т. Тлеулиева²

¹ Научный Центр хирургии им. А.Н. Сызганова;

² Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан

Инфекционный эндокардит (ИЭ) — фатальное заболевание, общая смертность при котором приближается к 100 %. Цель работы — оценить клинические и иммунологические показатели у больных ИЭ при сочетании хирургической операции на клапанах сердца и внутривенных инфузий российского препарата Ронколейкин (человеческий рекомбинантный IL-2). Оценивали выживаемость больных, а также активность стимулированных митогенами КонА и ЛПС Т- и В-клеток в реакции бластной трансформации (МТТ-тест), продукцию IL-2 КонА-индуцированными Т-клетками (ИФА) и продукцию IL-1 ЛПС-индуцированными моноцитами периферической крови (биологическое тестирование). До начала лечения у больных отмечалась тенденция к повышению активности Т- и В-клеток, повышенная способность к продукции IL-2 Т-клетками и сниженная продукция IL-1 ЛПС-индуцированными моноцитами по сравнению со здоровыми донорами. Применение Ронколейкина в качестве иммуномодулятора при хирургическом лечении ИЭ обеспечило ускорение послеоперационного восстановления, снижение летальности (до 6,7 %) и нормализацию иммунологических показателей. (Цитокины и воспаление. 2004. Т. 3, № 1. С. 28–31.)

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, Ронколейкин, терапия, иммунитет.

Инфекционный эндокардит (ИЭ) — фатальное заболевание, общая смертность при котором приближается к 100 %, несмотря на применение мощной антибиотикотерапии [4]. При этом гематогенная инфекция приводит к повреждению внутренней оболочки сердца (в основном клапанов сердца, предклапанного аппарата, подлежащих мышечно-фиброзных структур сердца) с остро возникшим пороком сердца с декомпенсацией кровообращения. С целью восстановления сердечной функции в НЦ хирургии им. А.Н. Сызганова используют хирургические методы лечения ИЭ, включая вживление искусственных клапанов сердца. Однако смертность при этом остается достаточно высокой (23,9 %). При лечении гнойно-септических заболеваний ятрогенного происхождения отмечена высокая эффективность применения российского иммуномодулирующего препарата Ронколейкин [3, 5, 8], в том числе у кардиохирургических больных [1]. На основании этого в НЦ хирургии им. А.Н. Сызганова в Алматы были проведены

клинические испытания Ронколейкина при хирургическом лечении больных ИЭ. Ронколейкин использовали в качестве вспомогательного терапевтического средства. Целью работы явилось изучение клинического эффекта Ронколейкина, а также оценка некоторых иммунологических показателей в ходе комплексного лечения ИЭ.

Материалы и методы

Характеристика и схема лечения больных. Ронколейкинотерапию проводили 15 больным с ИЭ в возрасте от 8 до 59 лет, поступившим в НЦ хирургии им. А.Н. Сызганова по поводу хирургического лечения клапанных пороков сердца. Все больные длительное время (от 5 до 25 лет) имели в анамнезе ревматизм с наложением инфекционного процесса на уже существующие пороки сердца (изолированные поражения аортального, митрального, трикуспидального клапанов и их сочетания). До поступления в клинику больные получали максимальную антибиотикотерапию от 1 мес. до 2 лет. Однако в четырех случаях операции были произведены на фоне бактериемии в связи с неэффективностью антибактериальной терапии и прогрессирующей сердечной недостаточностью.

Беляев Николай Николаевич, e-mail: belyaev_nikolai@hotmail.com

Всем больным было выполнено протезирование клапанов с использованием нового способа профилактики раннего рецидива, заключающегося в местном введении антибиотика Максипин в область фиброзного кольца после протезирования. Ронколейкин больные получали инфузионно, капельно в 400 мл физиологического раствора по следующей схеме. За день до операции вводили Ронколейкин в дозе 1 млн МЕ, затем повторяли введение в той же дозе через 2 дня после операции и еще через 2 дня вводили 500 тыс. МЕ.

Оценку иммунологических функций проводили рандомизированно у 10 больных перед введением Ронколейкина и спустя 7–14 дней после последнего введения в стадии клинического улучшения. В качестве контроля использовали кровь шести здоровых доноров, полученную в Республиканском Центре крови (Алматы).

Оценка иммунологических показателей. О состоянии иммунной системы судили по активности клеток периферической крови в нагрузочных тестах клеточных культур *in vitro*. Активность Т- и В-клеток периферической крови определяли в реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) с использованием МТТ-теста. Для этого мононуклеарную фракцию выделяли из гепаринизированной крови на градиенте плотности перколла (1,076 г/мл) (Pharmacia, Switzerland). Затем моноциты отделяли от лимфоцитов путем адгезии, инкубируя отмытую суспензию мононуклеаров (5×10^5 кл/мл) в среде RPMI 1640 с добавлением стандартных антибиотиков и 10%-ной фетальной телячьей сыворотки (HighClone Laboratories Inc., USA) в 24-луночных планшетах (Flow Lab., UK) в течение 3 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Для оценки митоген-индуцированной (пролиферативной) активности неприлипшие клетки в концентрации 2×10^5 кл/мл культивировали в 96-луночных планшетах (Flow Lab., UK) при тех же условиях в присутствии либо Т-клеточного митогена конканавалина А (КонаА, 5 мкг/мл; Pharmacia, Switzerland), либо В-клеточного митогена ЛПС *S. typhimurium* (CalBiochem Hoechst, Germany) в течение 72 ч. За 4 ч до окончания срока в лунки вносили препарат МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид] (Sigma, USA) в конечной концентрации 250 мкг/мл. После этого культуральную среду из лунок удаляли, добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО; Sigma, USA) для растворения кристаллов восстановленного формазана и измеряли экстинкцию на иммуноферментном анализаторе StatFax-2100 (Awareness Technology Inc., USA) при $\lambda = 492/630$ нм. Индекс митоген-индуцированной активности клеток вычисляли по формуле: $[(O - K)/K] \times 100\%$, где O — среднее значение экстинкции из 3–4 повторов в опыте (в присутствии митогена), K — то же самое в контроле (в отсутствие митогена).

Часть лунок с КонаА-активированными лимфоцитами без МТТ использовали для оценки продукции IL-2. Для этого супернатанты 72-часовых клеточных культур (не менее 3 лунок) объединяли и исследовали в двух повторах на присутствие IL-2 с помощью ИФА, используя коммерческую тест-систему («Протеиновый Контур», С.-Петербург).

Об активности моноцитов судили по продукции IL-1 прилипающей фракцией мононуклеарных клеток периферической крови. К прилипшим клеткам, полученным, как описано выше, добавляли по 0,5 мл полной культуральной среды, содержащей 25 мкг/мл ЛПС, и культивировали 72 ч в стандартных условиях. Затем бесклеточные супернатанты тестировали на наличие IL-1 в биологическом тесте костимуляции тимоцитов 3-недельных мышей [2]. Для этого тимоциты выделяли из тимуса мышей с помощью стеклянного гомогенизатора, вносили в 96-луночные планшеты в концентрации 10^6 клеток в 100 мкл

среды и культивировали 72 ч в присутствии 2 мкг/мл КонаА. За 4 ч до окончания инкубации в лунки вносили МТТ. Далее осуществляли процедуры, как при оценке пролиферативной активности клеток.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel на персональном компьютере, используя стандартные функции, включая среднюю арифметическую и среднюю квадратическую ошибку средней арифметической. Достоверность различия между вариационными рядами определяли, используя статистическую функцию ТТЕСТ.

Результаты и обсуждение

У всех больных отмечалось резкое улучшение самочувствия уже после первой инфузии Ронколейкина. Больные быстрее выходили из послеоперационного состояния, снижалась температура, уменьшался объем гноя в ране в случае нагноения по сравнению с больными, которых не лечили Ронколейкином. Ускорялась грануляция раны. Рана становилась сухой уже через неделю. Послеоперационные осложнения со стороны внутренних органов и головного мозга не отмечались. Из 15 больных, которым проводили лечение Ронколейкином, выжило 14 человек (смертность 6,7 %).

Результаты оценки Т- и В-системы иммунитета представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, больные ИЭ до лечения значительно не отличались от здоровых доноров по активности Т- ($p = 0,454$) и В-клеток ($p = 0,433$), несмотря на небольшое увеличение средних значений. Однако статистический анализ выявил достоверное снижение активности как Т- ($p = 0,005$), так и В-клеток ($p = 0,031$) в результате лечения. При этом достоверного различия с донорами также не наблюдалось ($p = 0,063$ и $p = 0,076$ соответственно).

Исследование продукции IL-2 Т-клетками в ответ на стандартный митоген КонаА показало следующие результаты (рис. 2). У больных ИЭ в

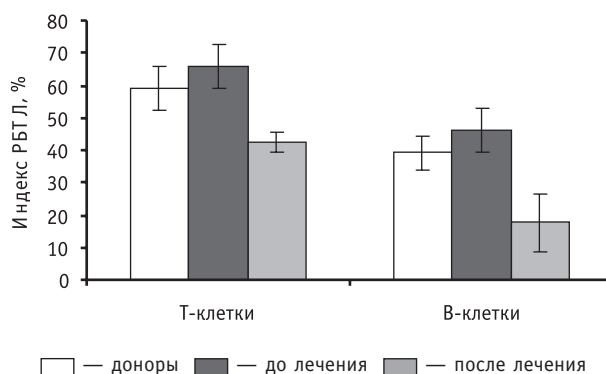


Рис. 1. Митоген-индуцированная активность Т- и В-клеток периферической крови больных ИЭ, получавших при лечении Ронколейкин, и здоровых доноров

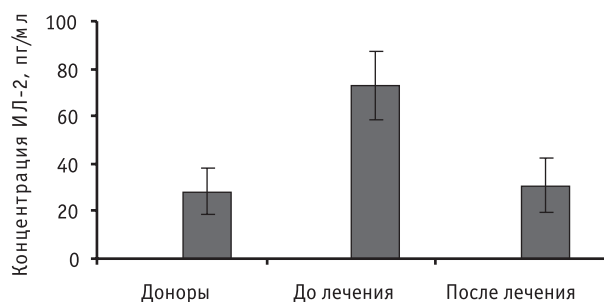


Рис. 2. Продукция ИЛ-2 КонА-индуцированными Т-клетками периферической крови больных ИЭ, получавших при лечении Ронколейкин, и здоровых доноров

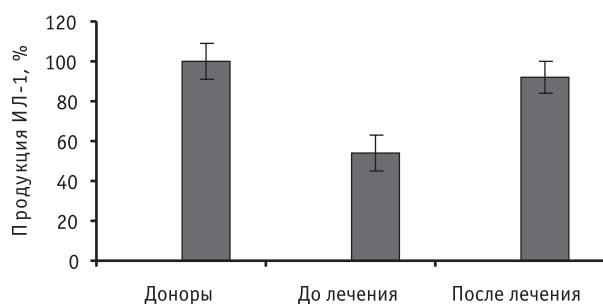


Рис. 3. Продукция ИЛ-1 ЛПС-индуцированными моноцитами периферической крови больных ИЭ, получавших при лечении Ронколейкина, и здоровых доноров

среднем наблюдалась достоверно-повышенная продукция ИЛ-2 КонА-индуцированными Т-лимфоцитами ($p = 0,035$), превышающая уровень продукции у доноров более чем в 2 раза. После лечения уровень продукции ИЛ-2 возвращался к норме ($p = 0,855$).

Оценка уровня продукции ИЛ-1 ЛПС-активированными моноцитами показала, что активность моноцитов периферической крови у больных ИЭ до лечения была существенно ниже ($p = 0,001$), чем у здоровых доноров (рис. 3). После лечения этот показатель возвращался к норме ($p = 0,495$).

Используемые нами нагрузочные функциональные тесты с митогенами позволяют оценить потенциальные возможности Т-, В-лимфоцитов и моноцитов/макрофагов [6], являющихся ос-

новными иммунокомпетентными клетками, осуществлять свои специфические функции. Таким образом, тенденцию к повышению активности Т- и В-клеток можно объяснить тем, что у большинства обследованных больных ИЭ как Т-, так и В-системы иммунитета находились в активированном состоянии. Об этом же свидетельствует повышенная способность Т-лимфоцитов к продукции ИЛ-2. Возможно, эта ситуация связана с персистенцией аутоиммунного процесса у обследуемых больных, в анамнезе которых отмечалось длительное заболевание ревматизмом. Тем не менее, по-видимому, такая избыточная активность не позволяла создать адекватный иммунный ответ на хроническую бактериальную инфекцию. Причиной этому, очевидно, была сниженная способность моноцитов к продукции ИЛ-1. Известно, что эта функция тесно связана также со способностью к экспрессии МНС-молекул, а значит, с нормальной презентацией антигенов. Удаление хронических очагов инфекции вместе с пораженными сердечными клапанами во время хирургической операции в сочетании с массивным введением экзогенного ИЛ-2 в виде Ронколейкина полностью восстанавливало ИЛ-1-синтезирующую функцию моноцитов/макрофагов, что приводило к ускоренной санации организма и, как следствие, к понижению избыточной активности Т- и В-клеток. Полученные нами данные подтверждают также представление о том, что для нормального завершения иммунного ответа на бактериальные антигены совершенно недостаточно повышенного напряжения только Т- и В-клеточного звена адаптивного иммунитета. В равной мере необходимо также наличие высокой активности естественного иммунитета, показателем которого служит нормальная продукция ИЛ-1 моноцитами/макрофагами [7].

Исходя из полученных данных можно заключить, что применение Ронколейкина в качестве высокоэффективного иммуномодулятора при хирургическом лечении ИЭ обеспечивает ускорение послеоперационного восстановления, максимальное снижение летальности и улучшение основных иммунологических показателей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашинов Н.А., Серебряная Н.Б., Хубулава Г.Г. и др. Изменение иммунологических параметров у кардиохирургических пациентов при проведении терапии препаратом Ронколейкин // Мед. иммунол. — 1999. — Т. 1, № 3–4. — С. 114.
2. Исин Ж.М., Тугамбаев Т.И., Тлеулиева Р.Т. и др. Интерлейкин-1-индуцирующая активность полисахаридсодержащих антигенов клеточной стенки *Yersinia pestis* // Ж. микробиол. — 1989. — № 11. — С. 12–17.
3. Козлов В.К. Иммунопатогенез и цитокиноterapia хирургического сепсиса. — СПб.: Ясный свет, 2002. — 48 с.
4. Колесникова Н.И. Септический эндокардит в кардиохирургии. — М.: Медицина, 2001. — 160 с.
5. Останин А.А., Черных Е.Р. Эффективность цитокинотерапии Ронколейкином в комплексном лечении хирургических инфекций. — СПб.: СПбГУ, 2002. — 28 с.
6. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. Лимфоциты: Т. 3–5. — СПб.: Наука, 2001. — 390 с.
7. Ярилин А.А. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999. — 608 с.
8. Galkina O.V., Petrov S.V., Smirnov S.V. et al. Immunological effects following interleukin-2 therapy in patients with sepsis and peritonitis // 4th International Congress on the Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis. Munich, Germany. 4–8 March. — 1997. — P. 879–883.

Immunological estimation of Roncoleukin therapeutic efficacy in cardiosurgery treatment of infectious endocarditis

M.A. Aliyev¹, N.N. Belyaev², K.B. Abzaliev¹, N.S. Serikov¹, A.Yu. Bogdanov²,
Ph.G. Savvulidi², R.T. Tleulieva²

¹ A.N. Syzganov Scientific Centre of Surgery; ² M.A. Ajtkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Republic of Kazakhstan

Infectious endocarditis (IE) is a fatal disease that nearly always leads to mortality. The purpose of the work was clinical and immunological estimation of efficacy of intravenous infusion of russian medication Roncoleukin (human rIL-2) combined with surgical operation on the heart valves in patients suffering from IE. Survival and mitogen-induced T and B cell activity (ConA or LPS accordingly) by blastogenic transformation reaction in MTT test, and also IL-2 production by ConA-induced T cells (ELISA) and IL-1 production by LPS-induced monocytes (biological test) were estimated. Before treatment there was a tendency to increase of T and B cell activity, high production of IL-2 by ConA activated T cells and reduced level of IL-1 production by LPS activated monocytes relatively to healthy donors. Application of Roncoleukine as an immunomodulator after surgical therapy of IE resulted in acceleration of postsurgical rehabilitation, reduction of mortality (to 6,7 %), and normalization of immunological indices. (Cytokines and Inflammation. 2004. Vol. 3, № 1. P. 28–31.)

Key words: infectious endocarditis, Roncoleukin, therapy, immunity.

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

г. Новосибирск, 630099, ул. Ядринцевская, 14
Телефон (3832) 22-26-74, факс (3832) 22-70-28
E-mail: dir@online.nsk.su

Клиника иммунопатологии

отделение аллергологии
отделение аутоиммунных заболеваний
отделение вторичных иммунодефицитов
отделение гематологии и трансплантации костного мозга с Центром трансплантации костного мозга

Межрегиональный Центр цитокинотерапии

Прием больных следующих категорий:
• Вторичные иммунодефицитные состояния при гнойно-септических заболеваниях в терапевтической, хирургической, педиатрической и акушерско-гинекологической практике (осложненное течение гнойно-воспалительных заболеваний легких, брюшной полости и малого таза, мягких тканей и опорно-двигательного аппарата).
• Вторичные иммунодефицитные состояния при хронических неспецифических заболеваниях (трахеобронхит, бронхит, пиелонефрит, простатит, цистит, эндокардит).

- Рецидивирующая вирусная инфекция (герпес зостер, герпес простой).
- Аутоиммунные заболевания.
- Аллергические заболевания.

Оценка функциональной активности иммунной системы, определение экспрессии генов основных цитокинов.

Цитокинотерапия иммунодефицитных состояний и онкогематологических заболеваний, применение цитокинов для стимуляции регенеративных процессов при повреждении органов и тканей.

Консультативная помощь врачам. База для обучения специалистов практического здравоохранения.