

КОРРЕКЦИЯ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ НА ОСНОВЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

Сускова В.С., Темнов А.А., Темнова В.В., Емец В.И., Ермакова Л.П., Быстрых О.А.
НИИ трансплантологии и искусственных органов Росздрава, Москва

Резюме

В данной работе для подбора иммунокорректоров у кардиохирургических больных был предложен метод индивидуальной оценки влияния лекарственных препаратов на функциональную активность лейкоцитов периферической крови в хемилюминесцентном тесте. Было показано, что индивидуальный подбор иммунокорректоров у кардиохирургических больных позволяет в короткие сроки добиться нормализации иммунологических показателей с более выраженным эффектом и устойчивой коррекцией иммунного дисбаланса.

Ключевые слова: иммунокоррекция, индивидуальный подбор иммуномодуляторов, метод хемилюминесценции, кардиохирургические больные.

Актуальность проблемы восстановления иммунологических нарушений у кардиохирургических больных с помощью иммунокорректирующих препаратов в настоящее время не требует обоснования. Она несомненна, поскольку фармакологическая коррекция вторичных иммунодефицитов (ВИД) как при дооперационной подготовке больных, так и на всех этапах послеоперационного периода позволяет снизить частоту послеоперационных осложнений [1, 2, 6, 10, 11, 12].

Общеизвестно, что степень нарушений показателей деятельности иммунной системы зависит от ее исходного состояния, силы влияния патологического процесса, срока заболевания, степени декомпенсации, возраста и т.д. Кроме того, различные варианты функционирования иммунной системы и возможная трансформация их при хирургическом лечении, особенно в условиях искусственного кровообращения, существенно затрудняют выбор иммунокорректирующей терапии.

Такие особенности иммунного ответа, многообразие нарушений функций, вариабельность иммунного реагирования будут проявляться в индивидуальной чувствительности к иммунотропным препаратам как среди здоровых лиц, так и среди пациентов с ВИД [7].

Даже при сходных условиях тестирования иммунотропных препаратов в одних исследованиях не обнаруживается значимого влияния на функции иммунокомпетентных клеток, в других показывается стимулирующее или угнетающее действие этих препаратов [3, 4, 8, 9].

Таким образом, суммируя данные, полученные в экспериментальных и клинических испытаниях, можно утверждать, что необходим индивидуальный подход к назначению иммунотерапии.

Целью нашего исследования явилась клиническая апробация метода индивидуального подбора имму-

номодуляторов *in vitro* для повышения эффективности иммунокоррекции ВИД у кардиохирургических больных.

Материал и методы

Обследовано 85 больных, поступивших на плановое хирургическое лечение по поводу клапанной патологии и ИБС. Группу наблюдения составили больные с ревматическими пороками сердца, с ишемической болезнью сердца и с инфекционным эндокардитом; контрольную группу – 25 здоровых доноров крови.

Наряду с общеклиническим обследованием проводили иммунологическое обследование больных в дооперационном периоде перед назначением иммунокоррекции и после завершения курса иммунотерапии. Изучение показателей иммунологической реактивности включало определение содержания лимфоцитов, Т-лимфоцитов (CD3⁺-клетки), их иммунорегуляторных субпопуляций Т-хелперов (CD4⁺-клетки) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺-клетки), а также относительного содержания натуральных киллеров (CD16⁺-клетки) с использованием комбинации моноклональных антител (МКАТ), меченых FITC и фикоэритрином (PE) (НПЦ «МедБиоСпектр» и «Сорбент»). Функциональная активность клеточного звена иммунитета оценивалась по количеству Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности рецептор к интерлейкину-2 (CD25⁺-клетки) и антигены II класса гистосовместимости HLA-DR (HLA-DR⁺-клетки), а также по числу пролиферирующих клеток (CD71⁺-клетки).

Показатели гуморального иммунитета оценивали по содержанию В-лимфоцитов (CD20⁺), концентрации иммуноглобулинов классов G, A, M в сыворотке крови (методом радиальной иммунодиффузии по Манчини) и ЦИК (осаждение 6% ПЭГ). При оценке

фагоцитарного звена иммунной системы определяли количественные показатели фагоцитоза (фагоцитарный показатель и фагоцитарное число).

Оценку интерферонового (ИНФ) статуса проводили иммуноферментным методом: определяли интенсивность спонтанной и митоген-индуцированной (ЛПС, ФГА) секреции ИНФ α , γ с использованием диагностических наборов фирмы «Цитокин» и «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург).

Для оценки эффективности иммунокоррекции на основе индивидуального подбора иммуномодуляторов все пациенты были разделены на две группы:

– **основная группа** – пациенты, получавшие иммуномодулятор, который в хемилюминесцентном тесте был определен, как препарат выбора для иммунокоррекции (n=43);

– **группа сравнения** – пациенты, получавшие иммуномодулятор, который назначался по выявленным отклонениям лабораторных показателей в иммунограмме (n=42).

При отработке метода индивидуальной оценки чувствительности кардиологических больных к иммуномодуляторам *in vitro* был использован метод люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) лейкоцитарной суспензии. Для получения лейкоцитарной суспензии использовали периферическую кровь кардиологических больных, включенных в исследуемую группу.

При постановке ХЛ-теста проводилась инкубация (60 минут при 37°C) лейкоцитарной суспензии с иммуномодуляторами в конечной концентрации, соответствующей расчетной концентрации, создаваемой в крови при введении разовой терапевтической дозы препарата.

Для проведения иммунокоррекции были использованы следующие препараты: полиоксидоний – N-оксидированное производное полиэтиленпиперозина с высоким молекулярным весом («Petrovax Farm», Москва); имунофан – синтетический гексапептид, представляющий собой 32-36 аминокислотные остатки тимопоэтина («Бионокс», Москва); циклоферон – низкомолекулярный индуктор интерферона – N-метилглукामीновая соль карбоксиметилакридона («НТФФ Полисан», Санкт-Петербург); реаферон – α -2 интерферон (ЗАО «Вектор-Медика», Россия). Иммуномодуляторы назначались по стандартным схемам, рекомендованным в аннотациях к препаратам.

Запись кривых хемилюминесцентных реакций проводили с использованием хемилюминометра «Хемилум-12» в комплексе с компьютером IBM-PC при температуре счетной камеры 37°C. В качестве зонда (усилителя свечения) использовали люминол («Sigma», США) в концентрации 10^{-3} М, а в качестве активатора «респираторного взрыва» применяли

форбол-12-мирилат-13-ацетат (РМА) («Sigma», США) в концентрации 10^{-6} М.

Интенсивность хемилюминесценции определяли по оценочному показателю S (светосумма), рассчитанному с помощью программного обеспечения, что позволяло провести сравнительную оценку в условных единицах (у.е.) интенсивности свечения кривой хемилюминесцентной реакции.

Иммуномодулирующий эффект препарата оценивали по индексу стимуляции – ИСП:

$$ИСП = S_{опыт} / S_{контроль}$$

где $S_{опыт}$ – интенсивность ХЛ в пробе с препаратом, $S_{контроль}$ – интенсивность ХЛ в контрольной пробе (в среде Хенкса). Препаратом выбора считали иммуномодулятор, индекс стимуляции которого был больше 1,1.

Полученные результаты обработаны с помощью статистических программ («Statistica 6.0», Statsoft, США) с использованием t-критерия Стьюдента. Различия значений считали достоверными при вероятности более 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При оценке иммунного статуса в дооперационном периоде у кардиохирургических больных перед назначением иммунокорректоров (табл.1) в обеих группах исследуемые показатели достоверно не отличались друг от друга ($p > 0,05$). Наблюдалось формирование ВИД по клеточному типу: недостаточность Т-лимфоцитов и их основных иммунорегуляторных субпопуляций: Т-хелперов ($CD4^+$) и $CD8^+$ -цитотоксических Т-лимфоцитов. При сравнительном анализе распределения основных субпопуляций лимфоцитов отмечено также снижение уровня В-лимфоцитов ($CD20^+$) и повышение содержания естественных киллеров (NK-клеток- $CD16^+$). При этом следует отметить, что недостаточность клеточного звена со снижением общей клеточности, обуславливающей лимфопению, сопровождалась повышением функциональной активности ($CD71^+$, ИЛ-2R-кл.- рецепции к ИЛ-2, экспрессии HLA-DR II класса гистосовместимости).

При оценке состояния гуморального иммунитета до проведения иммунотерапии в исследуемых группах кардиохирургических больных была выявлена активация гуморального звена (IgG и IgM, ЦИК), свидетельствующая о возможной персистенции антигена инфекционной или аутологической природы, а также характеризующая активный воспалительно-деструктивный процесс, протекающий остро, на что указывают высокие значения ЦИК (накопление продуктов реакции антиген-антитело) и, в частности, повышенный уровень IgM.

Анализ состояния фагоцитарно-макрофагальной системы, которая является ключевым звеном противомикробного иммунитета, до проведения имму-

Таблица 1

Динамика показателей иммунного статуса кардиохирургических больных при проведении иммунокоррекции

Иммунологические показатели, %	Контрольная группа (n=25)	До иммунокоррекции		После иммунокоррекции	
		Группа сравнения (n=42)	Основная группа (n=43)	Группа сравнения (n=42)	Основная группа (n=43)
Лимфоциты	32,5±4,8	24,4±2,6	27,2±2,2	24,2±1,9	30,0±2,0 ↓ +
Т-лимфоциты (CD3 ⁺)	67,5±4,6	60,0±3,0 ·	58,4±3,4 ·	65,1±2,3 ↓	69,8±2,5 ↓*
Т-хелперы (CD4 ⁺)	43,9±3,7	34,6±1,6 ·	32,0±3,1 ·	37,0±2,5 ↓	45,5±2,4 ↓*+
Т-цитотоксические (CD8 ⁺)	28,1±3,6	20,5±1,6 ·	16,7±2,2 ·	24,4±1,3 ↑*	25,7±2,0 ↑*+
В-лимфоциты (CD20 ⁺)	10,1±1,5	7,6±1,0	6,3±1,1	8,2±0,7 ↑	8,6±0,9 ↑*
NK-клетки (CD16 ⁺)	13,9±1,6	12,7±3,9	19,5±2,9 ·	13,8±1,4	14,5±2,0 ↓
HLA-DR	11,5±3,5	16,8±2,5	17,6±2,1 ·	13,0±1,1 ↓*	15,7±1,7 ↓
IL2-R ⁺ -кл. (CD25 ⁺)	3,2±1,6	4,6±1,1	5,6±0,9	4,0±1,2	3,3±0,1 ↓*+
CD71 ⁺	3,0±0,5	5,1±1,2 ·	8,7±2,0 ·	6,6±1,7 ↑	11,0±2,8 ↑+
IgG, г/л	13,0±0,9	14,0±2,2	15,5±0,9	16,0±1,0	16,0±1,8
IgA, г/л	2,5±0,4	2,0±0,4	2,5±1,1	3,0±0,2 ↑*	3,6±0,3 ↑*+
IgM, г/л	1,5±0,2	1,9±0,3	2,7±0,4 ·	1,7±0,2	1,6±0,4 ↓
ЦИК, у.е.	153,0±40,1	450,4±67,7 ·	588,0±155,3 ·	225,1±34,2 ↓*	350,5±55,3 ↓*
Фагоцитарный индекс, %	75,5±3,5	51,7±2,9 ·			
	52,7±2,8 ·	57,3±3,5	65,6±4,2 ↑*		
Фагоцитарное число, у.е.	5,5±1,7	3,5±0,3	3,1±0,2 ·	4,0±0,1 ↑*	5,0±0,8 ↑*+

Обозначения: · - достоверное различие с группой контроля (p<0,05); * - достоверное различие по сравнению с исходным уровнем (p<0,05); + - достоверное различие с группой сравнения (p<0,05); ↑, ↓ - повышение/снижение показателя по сравнению с исходным уровнем.

нокоррекции выявил нарушение функциональной активности нейтрофилов/моноцитов, проявляющееся существенным торможением поглотительной активности нейтрофилов по тесту фагоцитоза.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что современные методы оценки иммунного статуса позволяют обнаруживать пораженные звенья иммунной системы у кардиохирургических больных при патологии, однако, эти показатели являются неспецифическими, однотипными и происходят как на клеточном, так и на гуморальном уровне.

Эффект иммунокоррекции при нарушениях разных звеньев иммунной системы зависит от функциональной сопряженности и, особенно, от состояния эффекторного звена, каким считается система фагоцитов. Очевидно, что интегральным критерием действия иммуномодуляторов, как *in vitro*, так и *in vivo*, конечным итогом их назначения принято считать усиление функционального состояния нейтрофилов, оцениваемое по уровню фагоцитоза и кислородному метаболизму. Поэтому в нашей работе проблеме выбора иммуномодулятора мы попытались ре-

шить, оценивая чувствительность клеток периферической крови больных к препаратам в хемилюминесцентом тесте.

После проведения иммунокоррекции в обеих группах кардиохирургических больных наблюдалась нормализация показателей иммунного статуса. Однако проведенная иммунотерапия с определением чувствительности больного к иммуномодулятору показала более достоверные изменения клеточного звена иммунитета: повышение уровня лимфоцитов, Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций, В-лимфоцитов, а также снижение уровня NK-клеток до нормальных значений. Уменьшались признаки воспалительной реакции (снижение HLA-DR, ИЛ-2R-рецепции к ИЛ-2). При этом нормализация клеточного звена проходила с нарастанием пролиферативной способности клеток (CD71⁺).

После курса иммунотерапии в обеих исследуемых группах больных отмечена нормализация уровня В-лимфоцитов, нарастание уровня IgA, а также выявлено достоверное снижение уровня IgM и уменьшение содержания ЦИК. Однако более выраженный эф-

Таблица 2

Интерфероновый статус кардиохирургических больных при проведении иммунокоррекции

Интерфероновая реакция лейкоцитов	Норма (МЕ/мл)	Количество пациентов с уровнем ИНФ в пределах нормы, % (титры ИНФ, МЕ/мл)					
		Основная группа			Группа сравнения		
		До лечения	После лечения	p	До лечения	После лечения	p
ИНФ в сыворотке	<2-8	40 (18,5±0,1)	92 (7,9±2,2)	0,048	42 (17,2±2,3)	68 (10,5±1,8)	0,192
α-ИНФ	64-640	12 (45,3±12,5)	65 (69,0±13,7)	0,025	10 (40,2±12,2)	38 (61,5±12,7)	0,326
γ-ИНФ	32-64	8 (8,1±1,4)	78 (45,2±5,1)	0,01	8 (7,7±1,5)	18 (12,5±2,4)	0,722

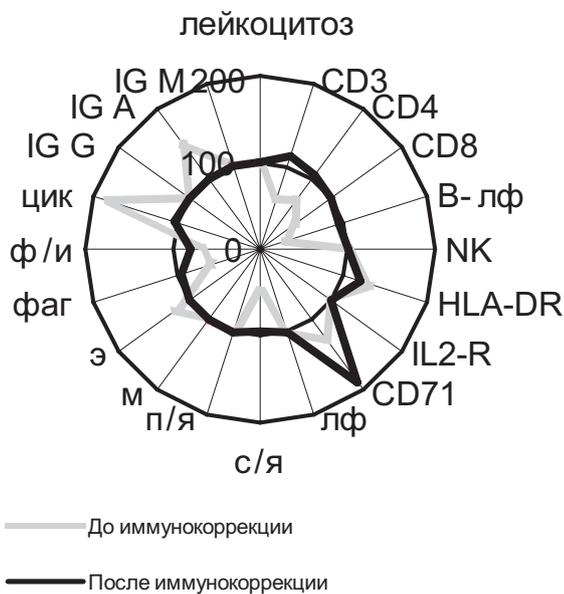


Рис. 1. Динамика иммунологических показателей больного Ж. до и после проведения иммунокорректирующей терапии полиоксидонием.

Круг – принятые за 100% иммунологические показатели здоровых доноров крови.

фект наблюдался в группе больных при определении чувствительности к иммуномодуляторам в хемиллюминесцентном тесте.

Использование индивидуально подобранной иммунотерапии обеспечивало достоверный, более выраженный эффект повышения фагоцитарных показателей в основной группе по сравнению с группой сравнения.

Таким образом, индивидуальный подбор, основанный на реакции клеток периферической крови на вводимый препарат, позволяет в течение короткого времени подобрать иммунокорректор, на который организм больного ответит нормализацией своих иммунологических показателей с устойчивой коррекцией ВИД.

Учитывая, что одним из ключевых параметров при введении в организм иммуномодулирующих препаратов, определяющих эффективность иммунного ответа, является профиль интерферонов в крови пациента, представлялось важным изучить содержание их до и после проведения иммунокорректирующей терапии.

При оценке ИФН-статуса у кардиохирургических больных выявлена картина нарушений системы интерферона, характеризующаяся определенной степенью повышения титра циркулирующего ИФН с одновременным подавлением ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов (табл. 2), наблюдаемая при стрессах, вирусных и бактериальных инфекциях [5].

После проведения курса иммунокорректирующей терапии наблюдалась существенная статистически

значимая по отношению к исходным данным динамика показателей интерферонового статуса. Наибольший стимулирующий эффект в отношении продукции интерферонов наблюдался у пациентов основной группы (на основе индивидуального подбора): уровень сывороточного ИФН в основной группе снижался до показателей нормы, средняя способность к продукции γ -ИФН увеличивалась более чем в 5 раз. Имевшее место снижение способности к продукции α -ИФН выросло на 50%, средние показатели α -ИФН повышались до нормальных значений. В то же время в группе сравнения после проведения иммунокоррекции отмечался менее выраженный эффект.

Следует отметить, что после проведения иммунокоррекции количество больных с нормальными показателями ИФН-статуса было достоверно выше в группе с определением индивидуальной чувствительности к иммунокорректору.

Проведение иммунокоррекции на основе индивидуального подбора иммуномодуляторов проиллюстрировано клиническим примером.

Клинический пример.

Больной Ж., (607/02), 59 лет, поступил в отделение 06.05.2002 г. с диагнозом: Атеросклероз с поражением коронарных артерий, ИБС, стенокардия напряжения, ФК III, постинфарктный кардиосклероз, хр. аневризма левого желудочка.

При проведении иммунологического обследования больного Ж. до иммунотерапии были выявлены отклонения в иммунной системе (рис. 1):

Исходя из полученных результатов иммунологического обследования больного Ж., наиболее рациональным явилось бы использование средств заместительной терапии: природные и синтетические пептиды тимуса (имунофан, тактивин, тималин), однако на основании проведенного индивидуального подбора иммуномодуляторов препаратом выбора был Полиоксидоний (рис.2):

ИСимунофан=0,9; ИС полиоксидоний=2,0; ИС-реаферон=1,1; ИСциклоферон=1,1.

Инкубация с другими препаратами не вызывала достоверных изменений параметров кривой ХЛР. Поэтому препаратом выбора явился Полиоксидоний, что свидетельствует о наличии способности этого иммунокорратора у данного больного стимулировать нейтрофилы, увеличивая их провоспалительный потенциал и возможность к более высокой генерации АФК, повышая тем самым бактерицидный потенциал клеток.

После проведения иммунокорректирующей терапии в комплексе консервативного лечения отмечалась положительная динамика изменений показателей иммунограммы с нормализацией клинического статуса.

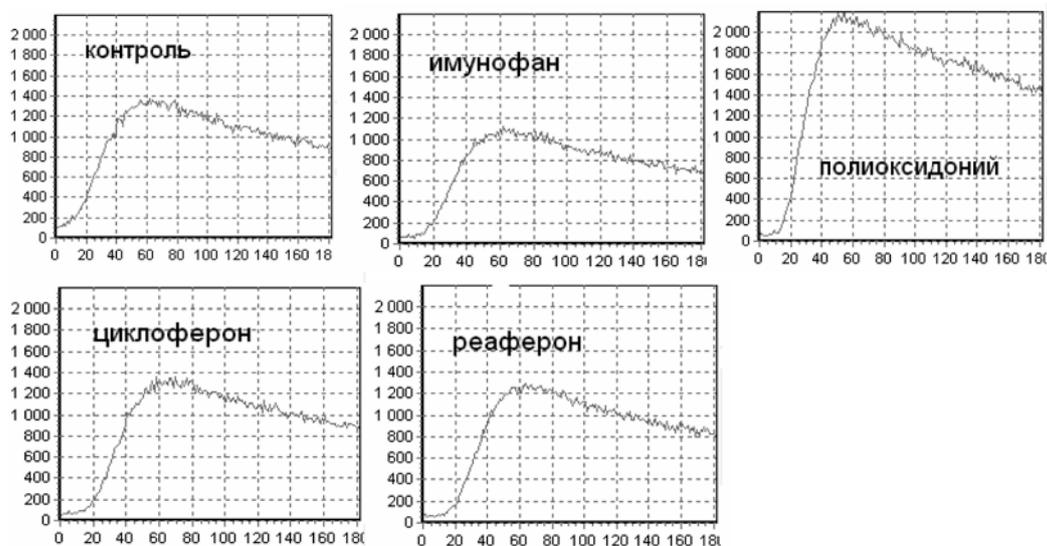


Рис.2. Кривые хемилюминесцентной реакции при анализе индивидуальной чувствительности к иммуномодуляторам у больного Ж.

Заключение

Результаты данного исследования показали, что иммуномодуляторы, отобранные в ХЛ-тесте, вызывают более выраженное, быстрое восстановление иммунного гомеостаза у больных по сравнению с препаратами, назначаемыми только по выявленным отклонениям в иммунограмме. Кроме того, отобранные в ХЛ-тесте иммуномодуляторы достоверно нормализуют показатели интерферонового

статуса, повышая способность клеток к выработке эндогенного α - и γ -интерферона, что будет определять быстрое купирование инфекционного процесса. Таким образом, алгоритм индивидуального подбора иммунокорректоров позволяет повысить эффективность лечения вторичных иммунодефицитов у кардиохирургических больных, улучшая тем самым результаты хирургического лечения заболеваний сердца.

Литература

- Белобородова Н.В., Попов Д.А., Бачинская Е.Н. Послеоперационные осложнения в кардиохирургии: современное состояние проблемы и перспективы // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия, 2004, №4, с.54-58.
- Бунятян К.А., Инвизева Е.В., Винницкий Л.И. Иммунокорректоры в комплексном лечении послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у хирургических больных и мониторинг иммунологических показателей // Анестезиология и реаниматология, 2004, №5, с.79-83.
- Дамбаева С.В., Мазуров Д.В., Голубева Н.М. и др. Влияние некоторых иммуномодуляторов на функциональную активность фагоцитарных клеток периферической крови доноров // Иммунология, 2000, № 6, с.15-20.
- Добротина Н.А., Прохорова М.В., Казачка Ж.А. Влияние полиоксидония и нативных иммуномодуляторов на иммунные реакции in vitro // Иммунология, 2005, т. 26, №3, с.152-155.
- Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М.: «Медицина», 1996, с.24-44.
- Карсонова М.И., Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Иммунокорригирующая терапия при хирургической инфекции // Анналы хирургической гепатологии, 1999, т.4, №1, с.88-95.
- Нестерова И.В., Сепиашвили Р.И. Иммунотропные препараты и современная иммунотерапия в клинической иммунологии и медицине // Аллергология и иммунология, 2000, т.1, № 3, с.18-28.
- Романцев М.Г., Аспель Ю.В. Циклоферон (таблетированная форма) в клинической практике. Санкт-Петербург, 2001, с.86-88.
- Самойленко О.И. Функциональная активность нейтрофильных лейкоцитов онкологических больных и ее регуляция $\alpha 2$ -интерфероном. Автореф. дисс. к.м.н., Москва, 2001, с.19-22.
- Ступина В.А., Гридчик И.Е., Коваленко А.Л. Применение иммуномодуляторов в хирургической клинике. Методическое пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей. Москва, 2005, с.14-34.
- Arndt P., Abraham E. Immunological therapy of sepsis: experimental therapies // Int. Care. Med., 2001, vol.27, p.104-115.
- Friedrich I., Silber R., Bauman B. et al. IgM-enriched j-immunoglobulin preparation for immunoprophylaxis in cardiac surgery // Eur. J. Med. I. Res., 2002, dec.17; 7(12): 544-549.

Abstract

The authors propose the method of individual assessment of immuno-correcting agents' effects on peripheral white blood cells activity (chemiluminescent test). In cardiosurgery patients individually selected immuno-correcting agents more effectively normalize immune status and correct immune dysbalance.

Keywords: Immunocorrection, individual immunomodulator selection, chemiluminescent method, cardiosurgery patients .

Поступила 10/11-2006