

На правах рукописи



Греченко Вячеслав Владимирович

**АНАЛИЗ БАЛАНСА ОППОЗИТНЫХ ЦИТОКИНОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕЦЕПТОРАМИ ВРОЖДЕННОГО
ИММУНИТЕТА, У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМИ ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ
СОСТОЯНИЯМИ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология



4856783

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

– 6 ОКТ 2011

Москва – 2011

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Ковальчук Леонид Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Козлов Иван Генрихович

доктор медицинских наук,
профессор

Винницкий Леонид Ильич

Ведущая организация:

ФГБУ ГНЦ "Институт иммунологии" ФМБА России

Защита диссертации состоится «*17*» *октября* 2011 года в *14⁰⁰* на заседании диссертационного совета Д 208.072.05 при ГОУ ВПО РГМУ Росздрава по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО РГМУ Росздрава по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1

Автореферат разослан « » 2011

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук, доцент

Кузнецова Татьяна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На сегодняшний день изучение системы врожденного иммунитета и, в частности, группы Toll-подобных рецепторов (TLR) является актуальным и одним из наиболее перспективных направлений современной иммунологии. Известно, что TLR осуществляют распознавание молекулярных паттернов, ассоциированных с различными патогенными микроорганизмами (Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMP), запуская, таким образом, эффекторные механизмы врожденного иммунитета [Bianchi M.E., 2007]. Активация TLR обуславливает экспрессию множества генов хемокинов и провоспалительных цитокинов. Помимо цитокинов, усиливается экспрессия молекул адгезии, противомикробных пептидов, белков острой фазы воспаления, NO-синтазы, циклооксигеназы. Все это приводит к развитию воспалительной реакции [Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. и др., 2007].

Кроме того, в настоящее время известно, что помимо бактериальных и вирусных компонентов, TLR могут распознавать и эндогенные молекулы, появляющиеся при повреждении тканей, т.е. молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (Damage-Associated Molecular Patterns - DAMP). За счет этого происходит вовлечение системы врожденного иммунитета в асептическое воспаление, удаление некротических масс и, впоследствии, восстановление поврежденной ткани [Bianchi M.E., 2007; Piccinini A.M., Midwood K.S, 2010]. Однако, изменение активности TLR, в частности, чрезмерная продукция провоспалительных цитокинов, приводящая к усилению воспалительного ответа, может становиться повреждающим фактором, вовлекаясь тем самым в патогенез основного заболевания [Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. и др., 2008]. Установлено участие TLR в патогенезе множества воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, сепсис,

системная красная волчанка, атеросклероз и инфаркт миокарда [Piccinini and A.M. et al., 2010; Erridge C., 2010].

Острый деструктивный панкреатит (ОДП) – заболевание, в основе которого лежит повреждение ткани поджелудочной железы, сопровождающееся воспалительной реакцией, приобретающей в той или иной степени системный характер, которая зачастую может приводить к полиорганной недостаточности [Weber C.K., Adler G., 2001; Shen Y. et al., 2011]. Этим объясняется высокий уровень смертности, составляющий более 10% в начальный период заболевания. В таких случаях очень важна возможность раннего прогноза течения острого деструктивного панкреатита, которая может дать преимущества при лечении заболевания.

В настоящее время имеется достаточно работ, посвященных изучению уровня провоспалительных цитокинов при ОДП. Установлено, что ведущую роль в патогенезе играют такие провоспалительные цитокины как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α , именно их гиперпродукция («цитокиновый шторм») в первой неделе заболевания может привести к развитию системной воспалительной реакции [Novovic S. et al., 2009; Shen Y. et al., 2011]. При этом повышение уровня ИЛ-6 и ИЛ-8 тесно коррелирует с тяжестью заболевания. Известно, что продукция этих цитокинов ассоциирована активацией TLR [Ding J. et al., 2009].

Однако до настоящего времени роль функциональной активности TLR при ОДП изучена недостаточно. Кроме того, не встречается работ по изучению роли соотношения уровней различных провоспалительных цитокинов, а также баланса про- и противовоспалительных цитокинов при ОДП. По нашему мнению не столько уровень, сколько баланс цитокинов может определять направление течения заболевания. Также представляется актуальным изучить возможность терапевтического воздействия направленного на коррекцию функциональной активности TLR при ОДП.

Цель исследования:

Определить выработку и баланс про- и противовоспалительных цитокинов, продуцируемых мононуклеарными клетками (МНК) периферической крови больных ОДП, под действием лигандов TLR, в динамике заболевания, и оценить их прогностическую значимость.

Задачи исследования:

- 1) Оценить спонтанную и индуцированную лигандами TLR2 и TLR4 продукцию про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови больных ОДП, по сравнению со здоровыми донорами
- 2) Оценить возможные различия в цитокиновом профиле МНК периферической крови больных ОДП.
- 3) Разработать метод оценки баланса нескольких цитокинов, продуцируемых МНК периферической крови больных ОДП, в динамике заболевания.
- 4) Оценить возможность прогноза течения заболевания по уровню и балансу цитокинов, продуцируемых МНК периферической крови больных ОДП, на ранних сроках заболевания.
- 5) Исследовать возможность терапевтического воздействия, направленного на коррекцию функциональной активности TLR при ОДП.

Научная новизна работы

Впервые получен профиль спонтанной и индуцированной лигандами TLR2 и TLR4 продукции провоспалительных (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8) и противовоспалительных (ИЛ-10) цитокинов в культуре МНК периферической крови больных ОДП в динамике заболевания, установлена его связь с течением заболевания. На основе разработанного нами способа оценки баланса цитокинов, продуцируемых МНК периферической крови, сформулированы критерии для оценки прогноза течения ОДП.

В опытах *in vitro* установлено, что нестероидное противовоспалительное средство лорноксикам подавляет индуцированную лигандами TLR продукцию исследуемых цитокинов. Выявлена возможность коррекции спонтанной и индуцированной лигандами TLR продукции МНК периферической крови больных ОДП провоспалительных цитокинов (преимущественно ФНО α и ИЛ-6) с помощью лорноксикама. Тяжесть течения и исход острого панкреатита зависят от смещения баланса цитокинов, индуцируемых через рецепторы врожденного иммунитета, фармакологическая коррекция позволяет изменять соотношения цитокинов, улучшая течение заболевания.

Практическая значимость работы

Выявленные изменения в соотношении продукции цитокинов на ранних сроках заболевания у больных с различным клиническим течением острого деструктивного панкреатита могут служить прогностическим критерием течения заболевания. Показано, что подавление выработки провоспалительных цитокинов при использовании лорноксикама на ранней стадии улучшает течение заболевания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Профиль цитокинов, продуцируемых мононуклеарными клетками периферической крови больных острым деструктивным панкреатитом, коррелирует с клиническим течением заболевания.
2. Баланс между ИЛ-6 и ИЛ-8 может служить прогностическим критерием течения и исхода острого деструктивного панкреатита на ранних сроках заболевания.
3. Коррекция профиля и баланса цитокинов позволяет изменять течение острого деструктивного панкреатита, направляя его в более благоприятную сторону.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в практической работе хирургического отделения ГКБ № 55 г. Москвы.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс студентов, ординаторов и аспирантов кафедр иммунологии и хирургии РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Апробация работы

Диссертация апробирована на совместной научной конференции кафедры иммунологии, кафедры экспериментальной и клинической хирургии и отдела иммунологии ГБОУ ВПО "РНИМУ им Н.И. Пирогова" от 05 апреля 2011 года.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на научных заседаниях кафедры иммунологии и отдела иммунологии ГБОУ ВПО "РНИМУ им. Н.И. Пирогова" МЗСР РФ, на Международной Пироговской Конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2011г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 6 в журналах, рекомендуемых ВАК Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 184 источника (11 отечественных и 173 зарубежных). Работа содержит 4 таблицы и 38 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Для экспериментальных исследований использовали кровь здоровых доноров и больных острым деструктивным панкреатитом. Всем больным ОДП диагноз был поставлен в соответствии с используемыми в клинике диагностическими критериями. Критерием отбора доноров было отсутствие инфекционных и аллергических заболеваний.

Группу I больных ОДП составили больные, находившиеся в стационаре ГКБ № 55 12 ± 3 койко-дней. К этому времени у них наблюдалось рассасывание перипанкреатического инфильтрата, т.е. наблюдался наиболее благоприятный вариант течения острого панкреатита. В данную группу вошли 16 человек в возрасте 20-60 лет: 9 мужчин и 7 женщин.

Группу II больных ОДП составили больные, находившиеся в стационаре 30 ± 10 койко-дней. У них наблюдалось менее благоприятное течение заболевания: асептическое расплавление и секвестрация очагов некроза в ткани поджелудочной железы. В данную группу вошли 14 человек в возрасте 35-60 лет: 8 мужчин и 6 женщин. Кроме того, в этой группе отмечено развитие ряда осложнений в течении ОДП, таких как ферментативный перитонит и формирование псевдокисты.

Все пациенты получали стандартную терапию, предусмотренную протоколом ведения больных с ОДП. Помимо нее, группе пациентов дополнительно проводилась терапия с использованием нестероидного противовоспалительного средства лорноксикам. Всего, среди набранных больных, присутствовало 16 человек, получавших дополнительно лорноксикам. Лечение остальных 14 человек проводилось с использованием только стандартной терапии.

Группой сравнения послужила группа здоровых доноров, состоящая из 20 человек в возрасте 20-45 лет: 11 мужчин и 9 женщин. Донорская кров

была любезно предоставлена отделением переливания крови и гравитационной хирургии РДКБ.

Выделение сыворотки. Кровь для получения сыворотки набиралась в пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем (олефиновый гель). После центрифугирования и полной ретракции сгустка сыворотку собирали и хранили в течение 2-3 месяцев при температуре -70°C . Концентрацию цитокинов в полученной сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Выделение мононуклеарных клеток. Суспензию МНК выделяли из периферической крови обследуемых по методу, основанному на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина ("Pharmacia", $\rho=1,077$ г/см³). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,1% раствора трипанового синего. Жизнеспособность клеток после выделения была выше 95%.

МНК культивировали в полной среде RPMI 1640 (НПП «ПанЭко»), содержащей гентамицин (ОАО "Дальхимфарм"), 10% сыворотки эмбрионов коров ("HyClone, Perbio") и 2мМ L-глутамин (НПП «ПанЭко»), в течение 24 и 48 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . Рабочая концентрация клеток составляла $1 \cdot 10^6$ в мл.

Стимуляция клеток. В качестве лигандов TLR использовали следующие стимуляторы: ЛПС (*E.coli* 0127: B8, «Sigma») и пептидогликан (*Staphylococcus aureus*, «Sigma/Fluka») в концентрациях 0,1 мкг/мл и 2,5 мкг/мл, соответственно. Контролем служили МНК, культивируемые в полной среде RPMI 1640. Супернатанты собирались и хранились в течение 2-3 месяцев при -70°C . Концентрацию цитокинов в полученных супернатантах определяли методом ИФА.

Оценка влияния лорноксикама на выработку цитокинов МНК периферической крови здоровых доноров *in vitro*. Выработку цитокинов МНК периферической крови здоровых доноров стимулировали лигандами TLR1/2 (ПГ) и TLR4 (ЛПС) в присутствии лорноксикама в концентрациях 10

мкг/мл, 100 мкг/мл и 150 мкг/мл. По окончании культивирования (24 часа) МНК осаждали центрифугированием при 400g в течение 15 минут, получали супернатанты и хранили в течение 2-3 месяцев при температуре -70°C .

Определение концентрации цитокинов. Для определения концентрации цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 и ФНО α в супернатантах культур клеток и в сыворотках крови использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа фирм Biosource и BenderMedSystems. Результаты анализа учитывали спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Оптическую плотность определяли на приборе Anthos 2020. Калибровочная кривая строилась автоматически по результатам, полученным для стандартов, и по ней определяли содержание определяемого цитокина в исследуемых образцах.

Статистическая обработка результатов проводилась статистическими методами с использованием программного пакета StatSoft Statistica 6. Для описания данных, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали медиану, а также 25-й и 75-й процентиля. Показатели, прошедшие проверку на нормальность описывали как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий применяли непараметрические критерии Вилкоксона и Манна-Уитни, а также параметрический критерий Стьюдента для связанных и несвязанных совокупностей. Различие средних показателей считалось достоверным, при уровне значимости менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение выработки провоспалительных и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови больных ОДП в динамике

На первом этапе исследования у больных острым панкреатитом нами исследовалась продукция провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-6 и ИЛ-8, а также противовоспалительного цитокина ИЛ-10 по всей совокупности набранных больных. Поскольку именно эти цитокины по данным литературы

имеют наибольшее значение в патогенезе данного заболевания. Это позволило оценить общую закономерность продукции про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови больных ОДП под действием лигандов TLR. В дальнейшем мы выявили особенности характерные для некоторых больных, на основании которых набранные пациенты были разделены на группы.

В результате выявлено, что у больных ОДП по сравнению с группой здоровых доноров наблюдается повышение индуцированной лигандами TLR, а в некоторых случаях и спонтанной выработки провоспалительных цитокинов ИЛ 6 и ИЛ 8 мононуклеарными клетками. Таким образом, мы можем сказать, что клетки экспрессирующие TLR у больных ОДП обладают повышенной функциональной активностью, проявляющейся в повышенной продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-8). К 7-14 суткам течения ОДП происходит усиление индукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Продукция ФНО α достоверно не отличалась от уровня здоровых доноров на протяжении всего исследуемого периода.

Изучение продукции про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови больных с разным течением ОДП

При оценке профиля продукции цитокинов МНК периферической крови больных ОДП была выявлена определенная закономерность. В соответствии с которой мы разделили исследуемых на две группы. При анализе клинических данных пациентов было установлено, что в I группе больных наблюдалось более благоприятное течение ОДП с более быстрым выздоровлением (пребывание в стационаре составило в 12 ± 3 койко-дней). Во II группе отмечается более длительное (30 ± 10 койко-дней), менее благоприятное течение заболевания.

Спонтанная продукция ИЛ-6 МНК периферической крови больных II группы достоверно ($\alpha=0,05$) повышена на 3 сутки заболевания и составила 106 (82-240) пг/мл и 1999 (1225-9120) пг/мл, в I и II группах, соответственно.

В остальные контрольные дни достоверных отличий не выявлено. При исследовании индуцированной лигандами TLR выработки ИЛ-6 МНК периферической крови (Рис. 1) в I группе больных ОДП наблюдается достоверное ($\alpha=0,05$) повышение этого показателя в 1-е сутки течения заболевания, уровень индуцированной продукции ИЛ-6 здесь составил 13526 (8106-17515) пг/мл и 7787 (5119-7942) пг/мл, в I и II группах соответственно. В динамике к 3-м суткам течения заболевания в I группе пациентов продукция ИЛ-6 достоверно снижается (7899 (6392-9006) пг/мл) относительно больных II группы (15636 (9009-19613) пг/мл) эти различия сохраняются до 7 суток заболевания.

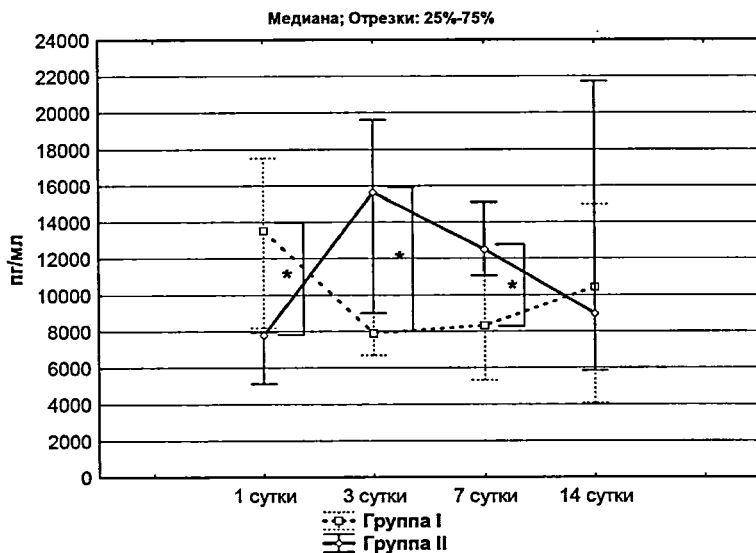


Рисунок 1. Индуцированная ЛПС продукция ИЛ-6 МНК периферической крови больных ОДП I и II групп в динамике. *- различия достоверны, $\alpha=0,05$

К 14-м суткам наблюдается снижение стимуляции и у больных I группы, к этому времени их продукция ИЛ-6 достигает уровня I группы больных.

При исследовании продукции ИЛ-8 МНК периферической крови больных ОДП, в I и II группах отмечается разнонаправленная динамик

продукции ИЛ-8. При оценке спонтанной продукции ИЛ-8 МНК (Рис. 2) в начале заболевания (1 сутки) продукция ИЛ-8 в I группе достоверно ($\alpha=0,05$) повышена относительно показателя больных II группы и составляет 18837 (17804-24486) пг/мл и 3875 (1948-10018) пг/мл, соответственно.

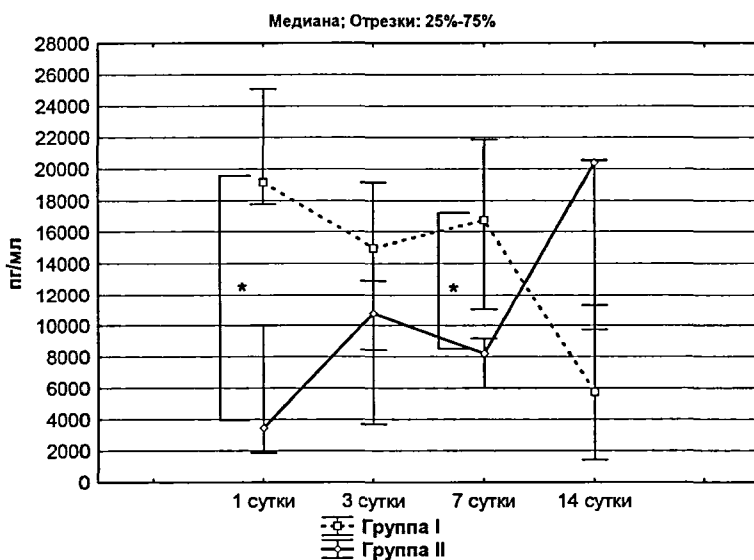


Рисунок 2. Спонтанная продукция ИЛ-8 МНК периферической крови больных ОДП I и II групп в динамике. *- различия достоверны, $\alpha=0,05$

В дальнейшем, к 3-м суткам эта разница уменьшается (статистически она отсутствует на уровне $\alpha=0,05$), хотя в I группе остается тенденция к сохранению высокого уровня продукции ИЛ-8. На 7 сутки мы видим статистически достоверное ($\alpha=0,05$) подтверждение этой тенденции: уровень спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-8 больных I группы в этот период выше, чем во II группе, составляя 16487 (11624-21775) пг/мл и 8189 (6011-9024) пг/мл, соответственно.

Между 7 и 14 сутками в динамике происходит «перекрест» кривых, уровень продукции ИЛ-8 МНК в исследуемых группах меняется на противоположный. Несмотря на отсутствие статистической достоверности, можно говорить о наличии тенденции к усилению продукции ИЛ-8 во II

группе и, соответственно, снижению этого показателя в I группе больных ОДП.

Характер динамики профиля индуцированной ЛПС продукции ИЛ-8 МНК периферической крови больных ОДП в I и II группах аналогичен спонтанной продукции этого цитокина.

Продукция ИЛ-10 МНК периферической крови, как спонтанная, так и индуцированная лигандами TLR в 1-е сутки заболевания достоверно выше у больных I группы.

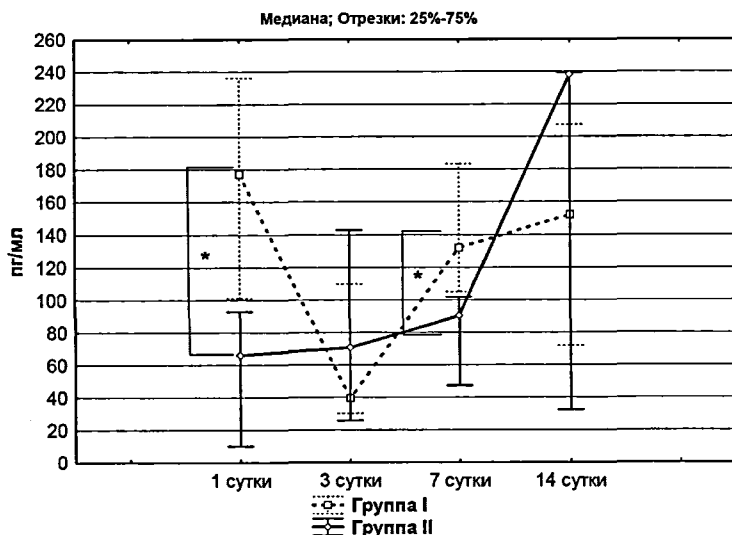


Рисунок 3. Индуцированная ЛПС продукция ИЛ-10 МНК периферической крови больных ОДП I и II групп в динамике. * - различия достоверны, $\alpha=0,05$

К 3 суткам течения ОДП у больных I группы происходит снижении спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-10, в этот период достоверных различий между больными I и II групп нет. К 7 суткам заболевания в I групп больных, по сравнению со II группой, вновь происходит увеличение продукции ИЛ-10. К 14 суткам к этому же уровню продукции приходят больные II группы, в этот период достоверных отличий между группами не наблюдается.

Таким образом, усиление продукции ИЛ-10, по всей видимости, отражает собой переход заболевания в репаративную фазу. Больные I группы, находившиеся в стационаре 12 ± 3 койко-дней, показывают достоверное увеличение продукции ИЛ-10 к 7 суткам, т.е. во второй половине срока заболевания. У больных II группы мы видим сходную тенденцию, но с учетом иного течения болезни: повышение уровня ИЛ-10 наблюдается к 14 суткам заболевания, с учетом сроков пребывания в стационаре (30 ± 10 койко-дней), тоже к середине срока заболевания.

Оценка баланса цитокинов, продуцируемых МНК периферической крови больных с разным течением ОДП в динамике

Большинство работ, посвященных изучению продукции различных цитокинов, как показателей, отражающих активность процесса воспаления и иммунного ответа, оценивает абсолютные значения уровня различных цитокинов. Однако нельзя забывать, что в организме цитокины образуют единую медиаторную сеть, в которой имеет значение не только уровень, но и соотношение различных цитокинов. Зачастую уровень цитокинов может сильно варьировать у различных индивидуумов, не отличающихся по иным показателям. Это может быть связано с полиморфизмом генов цитокинов и регуляторных молекул, участвующих в их продукции. Очевидно, что в таких случаях определение соотношения уровней может дать дополнительные критерии для оценки состояния больных.

Баланс или соотношение взаимосвязанных показателей, математически может определяться различными способами. Нами предложен метод оценки соотношения путем математического нахождения процентной доли одного из исследуемых показателей в общей сумме всех исследуемых показателей. В этом случае получаемый процентный показатель, будет отражать В нашем случае исследуемыми цитокинами были ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10. Исследуя баланс между этими цитокинами, на основе абсолютных значений

мы находили их доли в общей сумме. Например, для ИЛ-6 такой показатель равен:

$$\text{ИЛ6 (\%)} = \frac{\text{ИЛ6(нг / мл)}}{\text{ФНО}\alpha(\text{нг / мл}) + \text{ИЛ6(нг / мл)} + \text{ИЛ8(нг / мл)} + \text{ИЛ10(нг / мл)}} * 100\%$$

Эти показатели находились на каждом этапе исследования (в 1-14 сутки динамики заболевания) для спонтанной и стимулированной лигандами TLR продукции цитокинов МНК исследуемых больных. В дальнейшем проводилось оценка этих показателей: сравнение со здоровыми донорами, а также сравнение в группах больных с благоприятным и неблагоприятным течением ОДП.

Интенсивное увеличение уровня какого-либо цитокина приводит к увеличению его доли в общей выработке, одновременно с этим доля «отстающих» цитокинов уменьшится. Таким образом, можно судить о смещении баланса в сторону цитокинов, чей уровень нарастает более интенсивно.

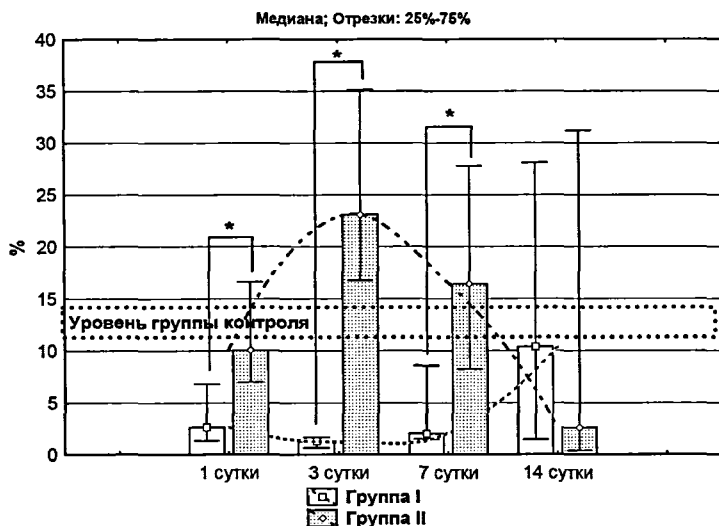


Рисунок 4. Доля ИЛ-6 в спонтанной продукции исследуемых цитокинов МНК периферической крови больных ОДП I и II групп. *- различия достоверны, $\alpha=0,05$

При сравнении исследуемых групп больных между собой в первую очередь обращает на себя внимание более высокая доля ИЛ-6 в спонтанной продукции цитокинов МНК на 1-7 сутки заболевания (Рис. 4).

При этом если соотнести эти показатели с группой контроля, мы видим, что здесь происходит четкое разделение групп. Показатели больных из I группы в этот период находятся ниже уровня группы контроля - 11,63 (11,09-14,89) %, в то время как показатели II группы достоверно выше (в 3 сутки заболевания) или не отличаются от этого уровня (в 1 и 7 сутки).

Сравнение показателей баланса ИЛ-6 при стимуляции лигандами TLR также выявляет существенные различия между исследуемыми группами. В 1 сутки заболевания доля ИЛ-6 в I группе достоверно повышена относительно этого показателя II группы, однако к 3 суткам ситуация меняется на противоположную и сохраняется таковой вплоть до 7 суток заболевания. При этом показатели обеих групп существенно выше уровня здоровых доноров на протяжении всего периода течения болезни, что не позволяет нам использовать показатели группы контроля для четкого разделения групп по этому показателю.

Продолжая сравнивать исследуемые группы, мы обнаружили существенные различия в доле выработки ИЛ-8. Доля ИЛ-8 в спонтанной продукции цитокинов МНК больных I группы достоверно выше уровня группы контроля в 1-7 сутки течения ОДП, в то же время этот показатель на 3 сутки достоверно выше, чем во II группе пациентов (Рис. 5).

В этом случае также можно установить критерий разделения групп на основании уровня здоровых доноров – 86,58 (80,99-87,24)%. Соответственно, если при оценке баланса доля ИЛ-8 будет ниже 81%, это может служить основанием менее благоприятного прогноза течения ОДП и более длительного срока госпитализации пациента с риском развития осложнений. Значения показателя выше 87% наоборот дает более благоприятный прогноз течения заболевания.

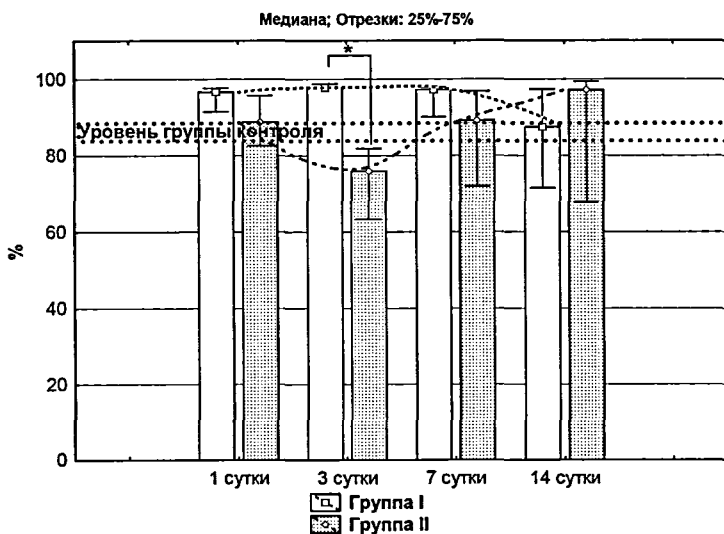


Рисунок 5. Доля ИЛ-8 в спонтанной продукции исследуемых цитокинов МНК периферической крови больных ОДП I и II групп. * - различия между группами достоверны, $\alpha=0,05$

Таким образом, мы можем сформулировать диагностический критерий, позволяющий на ранних сроках развития заболевания прогнозировать его дальнейшее течение (Табл. 1).

Таблица 1

Оценка показателей баланса продукции ИЛ-6 и ИЛ-8 в культуре МНК периферической крови для определения прогноза течения ОДП

	Доля спонтанной продукции МНК периферической крови	Благоприятное течение, низкая вероятность осложнений	Неблагоприятное течение, высокая вероятность осложнений
1 сутки	ИЛ-6 (%)	<11%	>11%
3 сутки	ИЛ-6 (%)	<11%	>15%
	ИЛ-8 (%)	>87%	>81%

В 1 сутки доля ИЛ-6 в спонтанной продукции исследуемых цитокинов на уровне 11 % является границей разделения, по которой мы сможем судить о дальнейшем течении заболевания. На 3 сутки течения ОДП можно уточнить сделанные ранее предположения: значение долей ИЛ-6 и ИЛ-8 в

спонтанной продукции цитокинов МНК менее 11% и более 87% соответственно, позволяют предположить дальнейшую положительную динамику ОДП. Повышение доли ИЛ-6 в спонтанной продукции более 15% с одновременным снижением доли ИЛ-8 менее 81% ухудшают прогноз течения болезни.

Влияние лорноксикама на опосредованную TLR 1/2 и TLR 4 выработку про- и противовоспалительных цитокинов *in vitro*

Одной из задач нашего исследования была оценка возможности коррекции баланса цитокинов, мы обратили внимание на следующий факт: часть исследуемых больных получала в качестве дополнительной терапии нестероидное противовоспалительное средство лорноксикам.

Мы изучили его влияние на продукцию цитокинов МНК периферической крови здоровых доноров под действием лигандов TLR *in vitro* (Табл. 2). Выявлено, что лорноксикам достоверно ингибирует выработку ФНО α , ИЛ-1 и ИЛ-6 в основном в ответ на ПГ, лиганд TLR1/2. Продукция ИЛ-8, ИЛ-12 и ИЛ-10 в ответ на ПГ и ЛПС подавляется лорноксикамом в равной мере.

Таким образом, лорноксикам достоверно ингибирует *in vitro* выработку как провоспалительных, так и противовоспалительного цитокина МНК здоровых доноров, опосредованную лигандами TLR1/2 и TLR4. Максимальный ингибирующий эффект лорноксикама на TLR опосредованную выработку цитокинов наблюдался в концентрации 150 мкг/мл. При этом наибольший подавляющий эффект достигается в случае стимуляции выработки цитокинов через TLR1/2.

Значительное снижение уровня провоспалительных цитокинов служит аргументом в пользу выраженного противовоспалительного эффекта лорноксикама и его способности воздействовать не только на метаболизм арахидоновой кислоты, но и на пути трансдукции сигнала через активированные TLR.

Таблица 2

Подавление лорноксикамом выработки про- и противовоспалительных цитокинов in vitro

	Стимулированная выработка (пг/мл)	Ингибирование (%)		
		Лорноксикам 10 мкг/мл	Лорноксикам 100 мкг/мл	Лорноксикам 150 мкг/мл
ФНО α	ЛПС 612 \pm 262	не влияет	12,85 \pm 8,72	33,43 \pm 29,77
	ПГ 1050 \pm 581	не влияет	29,71 \pm 13,27	70,86 \pm 19,96*
ИЛ-1	ЛПС 568 \pm 305	14,84 \pm 9,50	не влияет	42,69 \pm 27,30
	ПГ 2012 \pm 533	18,48 \pm 14,19	65,70 \pm 20,37*	85,71 \pm 5,19*
ИЛ-6	ЛПС 1736 \pm 443	9,35 \pm 6,09	4,76 \pm 3,64	29,47 \pm 7,29
	ПГ 1624 \pm 615	13,09 \pm 7,09	15,05 \pm 4,18	50,22 \pm 26,11*
ИЛ-8	ЛПС 11153 \pm 4050	7,41 \pm 5,67	36,50 \pm 31,44	60,63 \pm 22,51*
	ПГ 9958 \pm 4316	10,93 \pm 6,55	43,16 \pm 28,53	70,63 \pm 12,67*
ИЛ-10	ЛПС 84 \pm 61	не влияет	50,45 \pm 30,93	80,82 \pm 18,37*
	ПГ 36 \pm 23	13,97 \pm 8,24	18,25 \pm 14,34	86,92 \pm 8,88*
ИЛ-12	ЛПС 474 \pm 120	11,68 \pm 9,99	78,12 \pm 18,23*	85,11 \pm 11,08*
	ПГ 362 \pm 125	4,53 \pm 3,47	58,83 \pm 40,17	91,22 \pm 5,00*

Данные в таблице представлены в виде М \pm с, * - достоверность с уровнем значимости $\alpha=0,05$

Влияние лорноксикама на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови пациентов с ОДП в динамике

В результате исследования продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α) МНК периферической крови больных ОДП выявлено, что в группе пациентов, получавших лорноксикам, с 3 суток заболевания отмечается достоверно более низкий уровень провоспалительных цитокинов, чем в группе базисной терапии.

Так индуцированная ЛПС продукция ИЛ-6 МНК периферической крови достоверно ($\alpha=0,05$) ниже в группе, получавшей лорноксикам, на 3 и 7 сутки течения ОДП (Рис. 6).

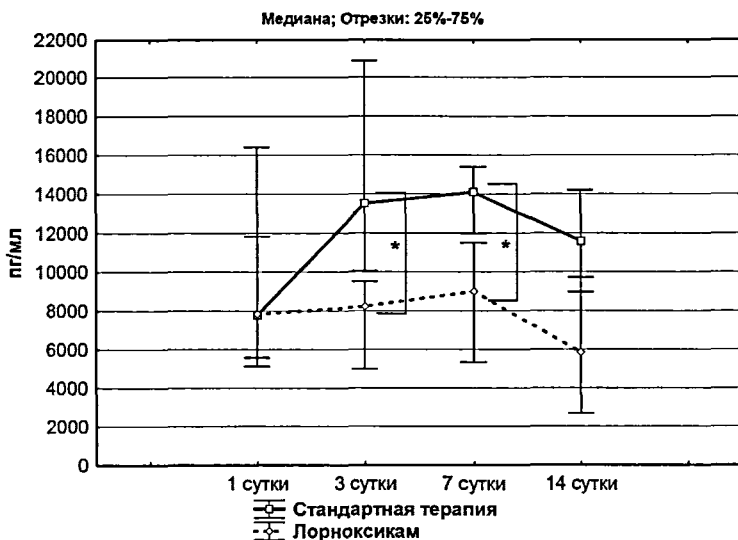


Рисунок 6. Индуцированная ЛПС продукция ИЛ-6 МНК периферической крови больных ОДП при стандартной терапии и терапии с применением лорноксикама. *- различия между группами достоверны, $\alpha=0,05$

Кроме того, в группе стандартной терапии в динамике наблюдается тенденция к повышению продукции ИЛ-6 МНК периферической крови, в то время как в группе лорноксикама заметна тенденция к снижению этого показателя от исходного уровня. Изменения в продукции ИЛ-8 МНК между

группами стандартной терапии и терапии с применением лорноксикама наблюдаются только при спонтанной продукции. Уровень продукции ИЛ-10 существенно не менялся. Эти данные во многом хорошо коррелируют с результатами, полученными на МНК здоровых доноров *in vitro*. Отсутствие ингибирующего эффекта в отношении ИЛ-10 можно объяснить исходно низким уровнем его продукции в период применения лорноксикама (1-3 сутки).

Все эти данные коррелируют с результатами, полученными при исследовании уровня цитокинов в сыворотке крови пациентов с острым панкреатитом. (Табл. 3).

Таблица 3

Содержание цитокинов в сыворотках крови больных с острым панкреатитом.

		Группа сравнения Медиана (25-75%)	Основная группа Медиана (25-75%)
ФНО α (пг/мл)	1 сутки	16,5 (12,4-20,5)	17,3 (9,2-25,4)
	6 сутки	17,3 (14,9-19,7)	14,2 (11,3-17,2)
ИЛ -6 (пг/мл)	1 сутки	8,2 (6,1-10,3)	313,29* (60,9-565,7)
	6 сутки	54,4 (0-108,7)	31,81 (1,01-6,61)
ИЛ-8 (пг/мл)	1 сутки	16,1 (1,2-30,9)	66,7* (54,1-79,4)
	6 сутки	38,5 (10,4-66,7)	32,66 (26,3-39,03)
ИЛ-10 (пг/мл)	1 сутки	2,3 (0,63-3,93)	2,2 (0,61-3,79)
	6 сутки	0,4 (0,16-0,64)	0,02 (0-0,04)

*- различия между группами достоверны, $\alpha=0,05$

Сопоставив эти данные с течением заболевания у исследуемых больных, мы выявили, что в группу лорноксикама вошло большинство пациентов с более благоприятным течением ОДП. Это также может быть свидетельством эффективности включения лорноксикама в терапию больных ОДП. Таким образом, применение лорноксикама на начальных этапах развития ОП позволяет предотвратить развитие системной воспалительной реакции

ВЫВОДЫ

1. Изучение в динамике (1-14 сутки) профиля цитокинов (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10), продуцируемых мононуклеарными клетками периферической крови спонтанно и под влиянием лигандов TLR, позволило выделить среди исследуемых больных две подгруппы, клинически характеризующиеся различными сроками выздоровления.
2. Более благоприятному течению заболевания, с выздоровлением в течение 12 ± 3 койко-дней, соответствует повышение по сравнению со здоровыми донорами индуцированной лигандами TLR выработки ИЛ-6 на 1 сутки, которая снижается к 3-м суткам заболевания. Спонтанная и индуцированная выработка ИЛ-8 в этой группе больных повышена и снижается к 14 суткам. Индуцированная лигандами TLR продукция противовоспалительного цитокина ИЛ-10 повышается к 7 суткам течения заболевания.
3. Менее благоприятное течение заболевания, с выздоровлением в течение 30 ± 10 койко-дней, сопровождается повышением, по сравнению со здоровыми донорами, спонтанной и индуцированной лигандами TLR выработки ИЛ-6, который возрастает с 3-х суток заболевания и остается высоким на 14 сутки наблюдения. Спонтанная и индуцированная лигандами TLR продукция ИЛ-8 МНК не отличается от уровня здоровых лиц в начальный период и повышается к 3-м суткам заболевания. Индуцированная лигандами TLR продукция противовоспалительного цитокина ИЛ-10 повышается к 14 суткам заболевания.
4. У больных с более благоприятным течением заболевания баланс провоспалительных цитокинов смещен в сторону ИЛ-8, в то время как у больных с менее благоприятным течением заболевания наблюдается смещение баланса в сторону ИЛ-6.
5. Изменение баланса спонтанной выработки ИЛ-6 и ИЛ-8 на 1-3 сутки заболевания может служить прогностическим критерием течения и исхода

острого деструктивного панкреатита. Оценка ФНО α не информативна в данной системе.

6. Лорноксикам оказывает подавляющее действие на выработку цитокинов, ассоциированных с TLR. В культуре *in vitro* наблюдается ингибирование продукции как про-, так и противовоспалительных цитокинов МНК здоровых доноров, стимулированных лигандами TLR2 и TLR4. У больных ОДП, получавших лорноксикам, наблюдается снижение спонтанной и стимулированной лигандами TLR продукции провоспалительных цитокинов МНК периферической крови, преимущественно ФНО α и ИЛ-6.

Практические рекомендации

Предложенный метод оценки баланса цитокинов целесообразно использовать на 1-3 сутки заболевания, для определения прогноза течения ОДП, с целью определения тактики ведения пациентов и подбор соответствующего метода терапии.

Тяжелым больным ОДП для снижения риска развития системной воспалительной реакции в качестве дополнительной терапии рекомендуется применение нестероидных противовоспалительных средств, в частности лорноксикама.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Хорева М.В., Ковальчук Л.В., Варивода А.С., Греченко В.В., Горский В.А., Агапов М.А., Леоненко И.В. Влияние ингибитора циклооксигеназы на опосредованную через TLR2 и TLR4 выработку цитокинов мононуклеарными клетками человека в норме и при остром панкреатите // *Российский иммунологический журнал* – 2009 -№3-4, 3(12), с 294-302
2. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Никонова А.С., Греченко В.В., Агапов М.А. Индароков В.А., Леоненко И.В., Горский В.А. Корректирующее действие ингибитора циклооксигеназы на функциональное состояние мононуклеарных клеток, экспрессирующих Toll- подобные рецепторы. ,

Журнал Микробиологии, эпидемиологии, иммунологии -2010 -№1, с. 45-50

3. Ковальчук Л.В., Никонова А.С., Хорева М.В., Юдин А.А., Греченко В.В. Кардиоиммунные взаимодействия на основе рецепторов врожденного иммунитета: состояние вопроса, перспективы развития. // Вестник РГМУ – 2010 - №1, с. 11-18
4. Шуркалин Б.К. Ковальчук Л.В. Агапов М.А. Хорева М.В. Индароков В.А. Ованесян Э.Р. Никонова А.С. Леоненко И.В. Греченко В.В. Горский В.А. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов в лечении панкреонекроза // Журнал Хирург – 2010 - с. 5-13
5. Горский В.А. Ковальчук Л.В. Агапов М.А. Хорева М.В. Ованесян Э.Р. Никонова А.С. Греченко В.В. Антимедиаторная терапия в комплексном лечении острого деструктивного панкреатита // Журнал Хирургия – 2010 - №3, с.54-61
6. Горский В.А. Агапов М.А. Ковальчук Л.В. Ованесян Э.Р. Хорева М.В. Никонова А.С. Леоненко И.В. Индароков В.А. Греченко В.В. Синдром системной воспалительной Реакции при остром панкреатите: особенности молекулярной патофизиологии и возможные пути коррекции. // Журнал Клиническая медицина – 2010 - №2, с. 39-44
7. Шуркалин Б.К. Горский В.А. Агапов М.А. Хорева М.В. Ованесян Э.Р. Индароков В.А. Никонова А.С. Греченко В.В. Влияние нестероидных противовоспалительных препаратов на медиаторы воспаления у больных панкреонекрозом. // Журнал Инфекции в хирургии – 2010 – Т. 8, № 2, с. 28-32
8. Баранова Е.Е. Греченко В.В. Хорева М.В. Анализ экспрессии и функциональной активности Toll-подобных рецепторов на мононуклеарных клетках у больных острым панкреатитом. // Материалы VI Международной Пироговской Конференции студентов и молодых ученых, 24 марта 2011 г., М. с. 20.

Список сокращений

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПС – липополисахарид

МНК – мононуклеарные клетки

ОДП – острый деструктивный панкреатит

ПГ – пептидогликан

ФНО – фактор некроза опухоли

TLR (Toll-like receptor) – Toll-подобный рецептор

DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

Подписано в печать: 13.09.11
Объем: 1,5 усл.п.л.
Тираж: 100 экз. Заказ № 801
Отпечатано в типографии «Реглет»
119526, г. Москва, пр-т Вернадского,39
(495) 363-78-90; www.reglet.ru