

ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПОСТОЯННОЙ ВЫСОКООБЪЕМНОЙ ГЕМОДИАФИЛЬТРАЦИИ (ПВГДФ)

Н. В. Пурло, А. А. Левина, Ю. И. Мамукова, Л. С. Бирюкова

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Time Course of Changes During Continuous High-Volume Hemodiafiltration

N. V. Purlo, A. A. Levina, Yu. I. Mamukova, L. S. Biryukova

Hematology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Цель исследования. Оценка динамики уровня цитокинов, ферритина и эндотелина в периферической крови и фильтрате у пациентов с полиорганной дисфункцией на фоне проведения ПВГДФ. **Материал и методы.** Обследовано 28 больных в возрасте от 32 до 69 лет с тяжестью состояния по шкале APACHE II от 31 до 36 баллов. **Результаты.** Выявлено, что до проведения ПВГДФ у больных отмечался повышенный уровень провоспалительных цитокинов в плазме крови. Во время ПВГДФ элиминировалось значительное количество цитокинов, причем уровень некоторых цитокинов в фильтрате был выше, чем в плазме крови, вероятно, в результате диссоциации медиаторов воспалительной реакции при прохождении через экстракорпоральный контур. **Заключение.** Отмечено, что уровни TNF- α , IL-2, IL-6 и IL-10 у выживших больных были значительно выше, а IL-1 β и ферритина ниже, чем у умерших. К концу лечения отмечена тенденция к нормализации цитокинов у выживших больных. После проведения дальнейших исследований будут определены возможности использования уровня некоторых цитокинов в качестве прогностических факторов оценки тяжести состояния больного. **Ключевые слова:** цитокины, ПВГДФ, полиорганная дисфункция.

Objective: to evaluate changes in the levels of cytokines, ferritin, and endothelin in the peripheral blood and filtrates of patients with multiple organ dysfunctions during continuous high-volume hemodiafiltration (CHVHDF). **Subjects and methods:** Twenty-eight patients aged 32 to 69 years with the severity of disease of 31 to 36 APACHE II scores were examined. **Results.** Prior to CHVHDF, the patients were found to have elevated plasma proinflammatory cytokines. During CHVHDF, the bulk of cytokines were eliminated, the levels of some cytokines were higher in the filtrate than in the plasma, presumably, due to the dissociation of inflammatory mediators passing through the extracorporeal circuit. **Conclusion.** In survivors, the levels of TNF- α , IL-2, IL-6, and IL-10 were much higher, but those of IL-1 β and ferritin were lower than those in deceased patients. By the end of treatment, there was a trend for cytokines to become normal in the survivors. The possibilities of using the level of some cytokines as predictors for the evaluation of patients' condition will be determined after further studies. **Key words:** cytokines, continuous high-volume hemodiafiltration, multiple organ dysfunctions.

Полиорганная дисфункция является наиболее частой причиной летальных исходов, связанных с сепсисом и септическим шоком. Хотя септический шок описан давно и определены его морфологические проявления, не ясен механизм, который инициирует это состояние. Большое значение в его развитии отводится цитокинам и их рецепторам, ответственным за интеграцию основных звеньев иммунной системы и регуляцию межклеточных взаимодействий, когда они выходят за рамки чисто медиаторных функций, приводя к несбалансированной гиперпродукции медиаторов и запуская каскад патологических реакций [1]. Образование цитокинов является ключевым событием, приводящим к шоку за счет раннего включения комплементарной системы и внутреннего пути активации гемостаза [2]. IL-1 β является триггером образования гепатоцитами белков острой фазы воспаления, располагает к развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) из-за сдвига активности клеток эндотелия в прокоагулянтную

сторону, снижая продукцию тромбомодулина, увеличивая антифибринолитическую активность и усиливая адгезию полиморфноядерных лейкоцитов к эндотелию (ПМЯЛ); помогает организму элиминировать экзо- и эндогенные повреждающие факторы [3]. Уровень IL-1 β в плазме крови в норме не превышает 17–20 пг/мл, но при выраженном инфекционном процессе может значительно увеличиваться, достигая наибольших значений у лихорадящих септических больных [4]. IL-2 считается ростовым фактором Т-лимфоцитов, может находиться в плазме в мономерной и в димерной формах, молекулярная масса которых составляет 26 кД и 13–15 кД, соответственно. В норме содержание IL-2 в плазме крови больше 500 пкг/мл, но может существенно снижаться при развитии инфекционных заболеваний. IL-6 — один из основных провоспалительных цитокинов. Он стимулирует развитие иммунного процесса, что ставит его в ряд важнейших факторов противоинфекционной защиты; является основным

гепатоцит-стимулирующим фактором, ответственным за продукцию белков острой фазы воспаления. Молекулярная масса IL-6 — 23,7 кД, в норме его уровень составляет не больше 15 пг/мл. IL-8 — нейтрофилактвирующий протеин, продуцируемый макрофагами, лимфоцитами и эпителиальными клетками. Его основная функция — обеспечение хемотаксиса нейтрофильных лейкоцитов человека. IL-8 представляет собой олигопептид с молекулярной массой — 8,8 кД, состоит из 99 аминокислот. В норме уровень IL-8 в плазме крови не более 17 пг/мл, но он повышается при сепсисе и кардиологических заболеваниях. IL-10 является противовоспалительным цитокином, продуцируется активированными моноцитами, Т- и В-лимфоцитами, подавляет продукцию IL-1, IL-6 и 8, играет важную роль при инфекционных заболеваниях [5].

TNF- α — один из основных цитокинов, синтезируемый в ответ на бактериальный стимул и имеющий выраженный противоопухолевый эффект. Большая часть образованного TNF- α короткоживущая и поэтому никогда не появляется в циркуляции. Возможно, многие патологические эффекты TNF- α обусловлены не циркулирующим, а локальным цитотоксином. Молекулярная масса TNF- α составляет 17 кД. Эндотелин (ЭТ) — пептид, секретируемый клетками эндотелия сосудов и выполняющий функцию вазоконстриктора/вазодилатора. При септическом шоке наблюдается резкое усиление свертываемости крови, поэтому представляется интересным определить уровень регуляторного белка, продуцируемого непосредственно клетками эндотелия сосудов. В связи с тем, что большинство водорастворимых медиаторов воспалительной реакции играет стратегическую роль в развитии сепсиса [6, 7] и полиорганной дисфункции, определение количественного уровня ряда цитокинов у данной категории больных при лечении методами заместительной почечной терапии является актуальной задачей.

Целью данного исследования являлось исследование динамики провоспалительных (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) и противовоспалительных медиаторов (IL-2, IL-10), ферритина и эндотелина в периферической крови и фильтрате у пациентов с полиорганной дисфункцией на фоне проведения ПВДФ.

Материалы и методы

Представлены результаты исследования 28 больных с полиорганной дисфункцией в возрасте от 32 до 69 лет (11 мужчин и 4 женщины), находившихся на лечении в ГИЦ РАМН. Больные были распределены на 2 группы: первая группа включала 13 больных (панкреонекроз — 6, акушерский сепсис — 4, перитонит — 1, геморрагический шок вследствие желудочно-кишечного кровотечения — 2), вторая группа — 15 больных с онкогематологическими заболеваниями в состоянии агранулоцитоза (острый лимфобластный лейкоз — 2, острый миелобластный лейкоз — 2, миелодиспластический синдром — 1, острый плазмоклеточный лейкоз — 2, хронический лимфолейкоз — 2, лимфосаркома — 3, лимфома — 1, множественная миелома — 2). У всех больных поводом к проведению процедуры ПВДФ был сепсис и полиорганная дисфункция с поражением от 5 до 8 органов, индекс тяжести по шкале APACHE II составлял от 31 до 36 баллов.

Для проведения процедуры использовали аппарат «искусственная почка» «Фрезениус 4008Е», фирмы «Фрезениус» (Германия), гемофильтры с полисульфоновой мембраной, скорость кровотока составляла 250–300 мл/мин, скорость диализирующего раствора — 300 мл/мин, объем субституата в режиме предилюции — от 5 до 12 л/час, что в течение суток составляло 130–180 л. Продолжительность непрерывного лечения в режиме «on-line» — от 5 до 42 суток.

Определение TNF- α , IL-1 β , IL-2 и IL-6 проводили наборами фирмы Pro Con (С.-Петербург, Россия); IL-8, IL-10 и эндотелина — с использованием моноспецифических и моноклональных антител фирмы Sigma (USA), ферритина — наборами фирмы Immunothec (Чехия). Исследование уровней интерлейкинов проводили в плазме крови и в фильтрате до и во время проведения гемодиализа. Пробы брали каждые 3–4 часа, всего исследовано 345 проб и проведено 3400 анализов. Использованы иммуноферментный и радиоиммунный методы.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что сопротивляемость инфекциям и выраженность развития защитной реакции в различные моменты времени существенно различаются у каждого отдельно взятого больного, анализировать уровень цитокинов в динамике крайне сложно.

Вследствие большого разброса значений интерлейкинов у разных больных даже одной группы был проведен подробный анализ, который показал возможность использования средних значений по группам.

Представлены результаты определения уровней интерлейкинов у больных 1-й и 2-й групп на фоне проведения заместительной почечной терапии (рис. 1 и рис. 2).

Анализируя полученные данные мы выяснили, что до проведения 1-й процедуры ПВДФ у больных отмечалась повышенная концентрация провоспалительных цитокинов в плазме крови. Однако, высокие значения всех определяемых цитокинов наблюдались в 1-й группе у 4-х из 5-ти больных (80%) и во 2-й группе — у 3-х из 10 больных (30%).

Значения TNF- α были повышены у всех больных как 1-й, так и 2-й группы, причем в 1-й группе средние значения TNF- α в плазме крови были в 3 раза выше, чем у больных гематологического профиля. Установлено, что у гематологических пациентов, находящихся в состоянии агранулоцитоза происходит снижение как спонтанной, так и индуцированной липосахаридом выработки TNF- α . При этом уменьшается не только количество продуцирующих клеток, но и нарушается их функция: одинаковое количество мононуклеарных клеток продуцирует меньшее количество TNF- α [8]. Во 2-й группе у 2-х больных до проведения ПВДФ определялся нормальный уровень TNF- α , но в процессе лечения его уровень в фильтрате повысился. Это может объясняться как замедленной реакцией иммунной системы, так и диссоциацией мембранного цитокина и рецептора на клетках. Интересно, что уже на 3-м часу проведения ПВДФ уровень TNF- α в фильтрате возрастал у гематологических больных приблизительно в 5 раз и оставался высоким в течение 12 часов, причем в фильтрате его уровень был выше, чем в плазме крови. В

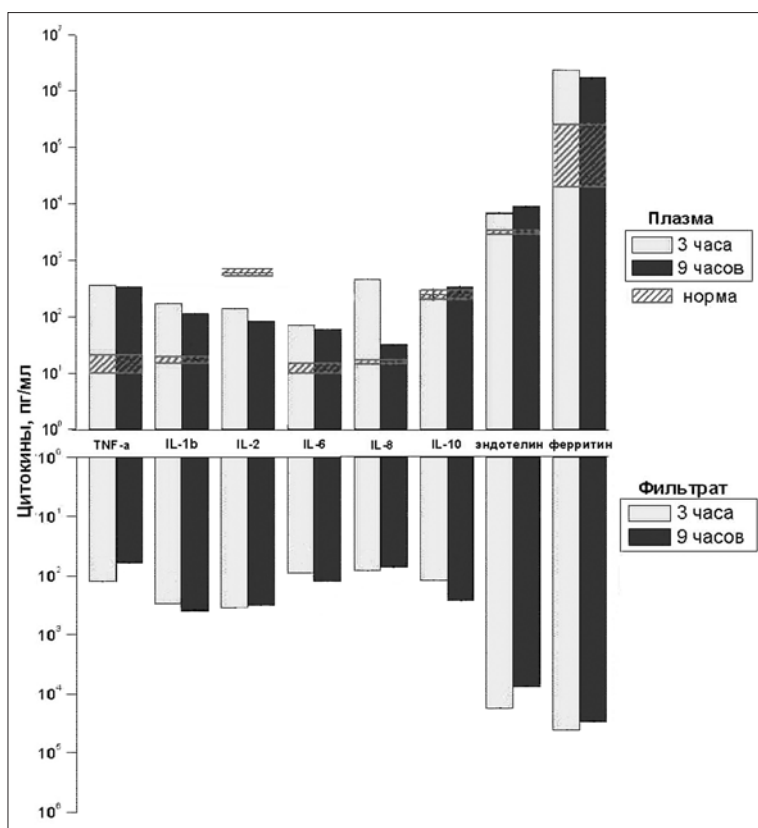


Рис. 1. Динамика уровней медиаторов воспалительной реакции в 1-й группе больных при проведении ПВДФ (логарифмическая шкала). ПВДФ — постоянная высокообъемная гемодиализация.

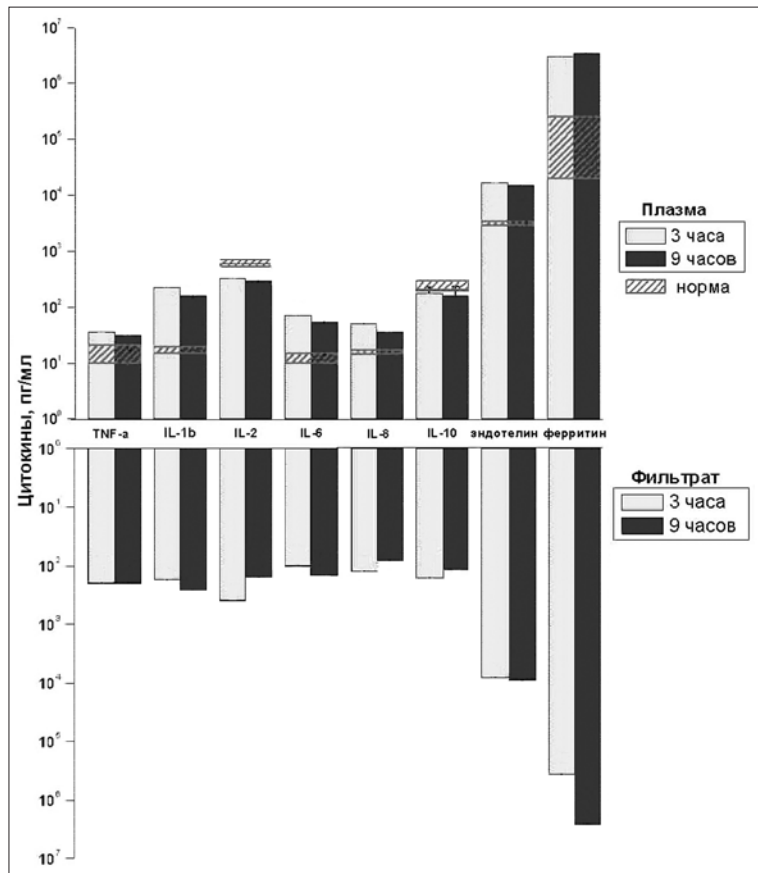


Рис. 2. Динамика уровней медиаторов воспалительной реакции во 2-й группе больных при проведении ПВДФ.

1-й группе значения $\text{TNF-}\alpha$ в плазме крови превышали норму приблизительно в 8–9 раз, в фильтрате их концентрации оставались ниже, чем в плазме, хотя и незначительно отличались от уровня $\text{TNF-}\alpha$ в фильтрате больных 2-й группы.

Как и можно было ожидать, уровень $\text{IL-1}\beta$ был повышен в обеих группах приблизительно в 10 раз до начала проведения ПВДФ. Это объяснимо, поскольку IL-1 является тем цитокином, который наравне с $\text{TNF-}\alpha$ в ответ на патогенный стимул инициирует развитие септического шока. У гематологических больных в течение всей процедуры средний уровень $\text{IL-1}\beta$ в плазме почти не изменялся, оставаясь стабильно высоким (165–223 пг/мл), а в фильтрате увеличивался приблизительно в 1,5–2 раза, к 9 часу ПВДФ превышая содержание в плазме (изменялся от 126 до 265 пг/мл).

Уровень IL-2 — одного из главных факторов иммунологической защиты организма в норме должен превышать 300 пг/мл. У больных 1-й группы он оказался снижен до 85–152 пг/мл, но оставался в пределах нормы во 2-й группе. Несмотря на это, в фильтрате определялось значительное количество IL-2 , причем в наибольшей степени это было отмечено у больных 1-й группы.

Повышение IL-6 , основного провоспалительного цитокина, наблюдалось в обеих группах до проведения ПВДФ примерно в 2 раза. Во время проведения процедуры ПВДФ, видимо происходило высвобождение этого цитокина из иммунных комплексов или рецепторов на клетках, что приводило к повышению его содержания в плазме крови.

Повышение уровня IL-8 на фоне лечения заместительной почечной терапией приблизительно в 8 раз наблюдалось во 2-й группе больных и в 3 раза — в 1-й группе.

Содержание IL-10 в плазме крови в норме приблизительно составляет 200–300 пг/мл. Повышение уровня IL-10 отмечалось во время проведения ПВДФ, причем у больных, имевших гематологические заболевания к 6 часу уровень IL-10 изменялся от 148 до 508 пг/мл, а у пациентов 1-й группы к 9 часу гемодиализации он увеличивался до 387 пг/мл. Возможно, это связано с тем, что у пациентов, находившихся в состоянии агранулоцитоза, снижение возможностей адекватной продукции

провоспалительных цитокинов приводило к повышенной выработке IL-10.

У подавляющего количества больных с сепсисом уровень эндотелина повышен в 5–6 раз, т. к. увеличение TNF- α и IL-1 β приводит к повышению адгезивности эндотелия сосудов и, следовательно, к гиперкоагуляции. У таких пациентов значения эндотелина достигали 21 нг/мл при норме менее 3 нг/мл. В связи с тем, что эндотелин имеет сравнительно небольшую молекулярную массу, он хорошо элиминировался во время ПВДФ. Это приводило к снижению его концентрации в плазме крови, хотя нормальных значений его уровня достигнуто не было.

В данном исследовании уровень ферритина рассматривался в качестве острофазового белка и показателя активности СМФ. Существенных различий между средними значениями в обеих группах не наблюдалось.

Анализируя полученные данные, мы выявили, что наблюдалась существенная разница в содержании интерлейкинов среди выживших и умерших больных (рис. 3 и рис. 4).

Уровень TNF- α в плазме крови у выживших больных в 9–10 раз превышал норму и был в 2–3 раза выше в сравнении с уровнем TNF- α умерших. Наоборот, высокий уровень TNF- α определялся в фильтрате умерших больных.

Изначально высокий уровень IL-1 в плазме крови у выживших больных снижался в 1,5 раза к 3 часу процедуры ПВДФ и почти в 3 раза — к концу лечения. В фильтратах определялся стабильно высокий уровень IL-1 как среди выживших, так и среди умерших больных.

При анализе уровня IL-2 у выживших больных отмечено, что уровень IL-2 в фильтрате был значительно выше, чем в плазме. Обратная зависимость между уровнем IL-2 в плазме и фильтрате наблюдалась среди умерших больных.

Уровень IL-6 в фильтрате умерших больных выше (26–101 пг/мл), чем в плазме (22,5–56 пг/мл). Это может быть связано как с возможностью лимфоидной ткани к синтезу этого цитокина, так и с наличием какого-либо агента, избирательно влияющего на элиминацию IL-6. Поскольку этот цитокин обладает способностью стимулировать пролиферацию клеток костного мозга, Т- и В-лимфоцитов и др., не исключается возможность, что его повышение в плазме крови ведет к более адекватной реакции организма на патогенный стимул, к элиминации данного медиатора воспалительной реакции и восстановлению гомеостаза организма.

Как у выживших, так и у умерших больных наблюдались колебания уровня IL-8 в течение проведения ПВДФ. При анализе содержания IL-10 в фильтрате у

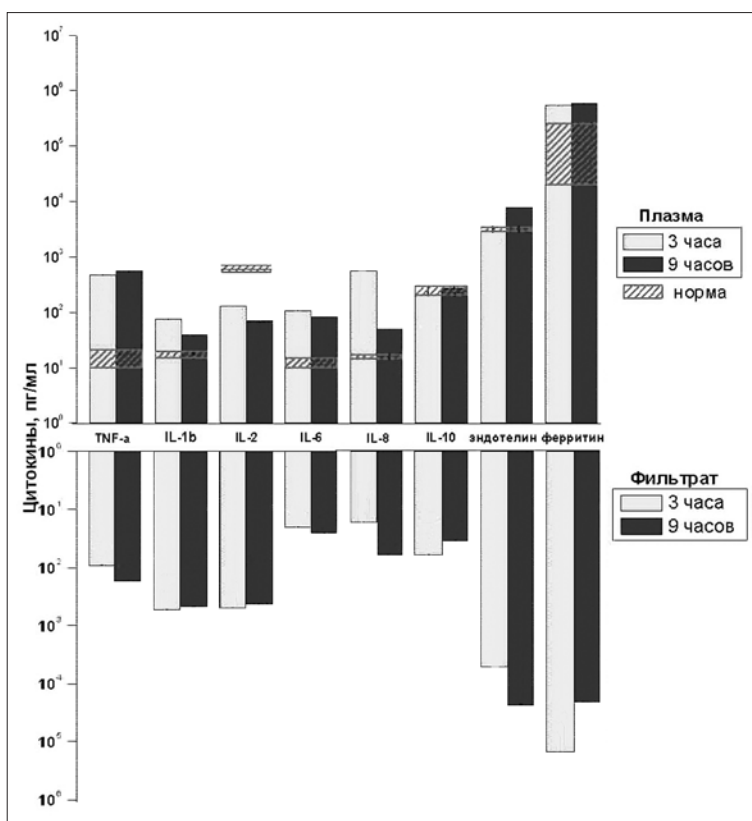


Рис. 3. Динамика уровней медиаторов воспалительной реакции выживших больных с полиорганной недостаточностью при проведении ПВДФ.

выживших и умерших больных выявлялись следующие различия: у выживших значения IL-10 были ниже, чем у умерших и постепенно снижались до 35 пг/мл к концу лечения, а у умерших значительно выше и колебались от 160 до 310 пг/мл.

Отмечено, что наблюдалась существенная разница уровней ферритина в плазме крови выживших и умерших больных. Молекула ферритина имеет большую молекулярную массу (≈ 500 КД) и не способна проникать через мембрану гемофильтра. Несмотря на это, ферритин был обнаружен в фильтратах. Можно предположить, что молекула ферритина диссоциирована и представлена в виде субъединиц, которые могут проходить через поры фильтра.

Таким образом, концентрации TNF- α , IL-2, IL-6 и IL-10 среди выживших больных были значительно выше, а IL-1 β и ферритина ниже, чем среди умерших. Во время проведения ПВДФ элиминировалось значительное количество цитокинов, что отражалось на значениях этих веществ в плазме крови.

Исходя из полученных результатов, наибольший интерес представляет анализ уровня каждого интерлейкина в динамике с учетом его содержания не только в плазме, но и в фильтрате. Оказалось, что все цитокины могут вымываться из плазмы крови в фильтрат, причем их значения в фильтрате часто превышают значения в плазме. Этот феномен можно, видимо, объяснить двумя причинами. Во-первых, это может быть связано с тем, что во время гемодиализа в результате разведения и присутствия

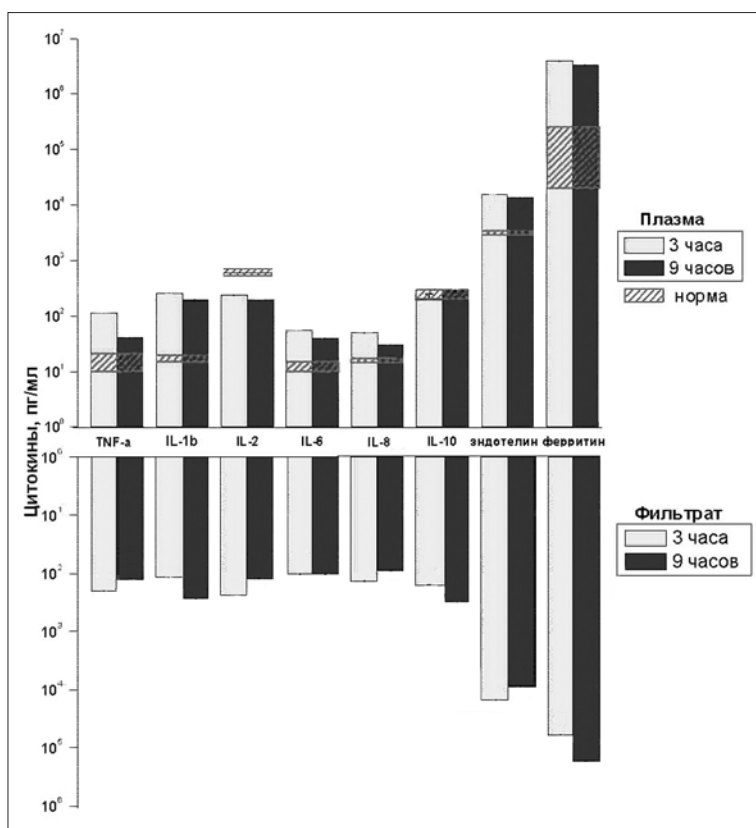


Рис. 4. Динамика уровней медиаторов воспалительной реакции умерших больных с полиорганной недостаточностью при проведении ПВДФ.

детергентов в диализирующем растворе может нарушаться связь мембранных форм интерлейкинов с клетками, в результате чего интерлейкины становятся растворимыми в плазме и затем могут вымываться в фильтрат, так как молекулярная масса их невелика (9–23 кД). Второй причиной высокого уровня интерлейкинов в фильтрате, возможно, является диссоциация циркулирующих иммунных ком-

Литература

1. Мороз В. В., Лукач В. Н., Шифман Е. М. и соавт. Сепсис: Клинико-патологические аспекты интенсивной терапии. Петрозаводск: ИнтелТек; 2004.
2. Ступин В. А., Румянцева С. А. Синдром полиорганной недостаточности в клинике неотложной хирургии. В кн.: Критические состояния в хирургии. М.; 2005.152–174.
3. Цыбульский Э. К. Сепсис в свете современных иммунологических воззрений. СПб.; 2002. 67.
4. Simmons E., Himmelfarb J., Sezer M. et al. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney International* 2004; 65: 1357–1365.

плексов, в состав которых могут входить как интерлейкины, так и антитела к ним. При их распаде уровень интерлейкинов в плазме крови повышается.

Заключение

Таким образом, выраженная элиминация некоторых цитокинов во время проведения высокообъемной гемодиализации при несоответствующих концентрациях в плазме крови указывает на наличие нековалентно связанных форм цитокинов, способных к диссоциации при прохождении через экстракорпоральный контур.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что нет необходимости исследовать почасовую динамику уровней интерлейкинов как в плазме крови, так и в фильтрате. Это объясняется тем, что при проведении достаточно трудоемкого исследования мы не увидели существенных динамических изменений уровней интерлейкинов в течение одной процедуры. Наиболее оптимально рассматривать уровни медиаторов воспалительной реакции на начальном и конечном этапах проведения каждой про-

цедуры гемодиализации/гемодиализации с целью проведения динамического анализа эффективности лечения данным методом.

После проведения дальнейших исследований будут определены возможности использования уровня некоторых цитокинов в качестве факторов оценки тяжести состояния больного и прогноза выживаемости.

5. Stuber F. Another definite candidate gene for genetic predisposition of sepsis: Interleukin-10. *Crit. Care Med.* 2003; 31: 314–315.
6. Ronco C., Brendolan A., Dan M. et al. Adsorption in sepsis. *Kidney International* 2000; 58: 148–155.
7. Tetta C., Bellomo R., D'Intini V. et al. Do circulating cytokines really matter in sepsis? *Kidney Int. Suppl.* 2003; 84: 69–71.
8. Галстян Г. М. Септический шок и острая дыхательная недостаточность в гематологической клинике: автореф. дис...д-ра мед. наук. М.; 2003.

Поступила 27.09.07