

## Иммуотропное действие ронколейкина при различных способах введения в условиях экспериментального распространенного гнойного перитонита

В.К.ГОСТИЩЕВ, В.А.КОСИНЕЦ

### Immunotropic influence of ronkoleukin at different ways of administration at experimental widespread purulent peritonitis

V.K.GOSTISHEV, V.A.KOSINETZ

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Исследование проведено на 70 кроликах-самцах породы шиншилла. Изучено влияние препарата «Ронколейкин» на динамику функционального состояния митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток крови, Пейеровых бляшек, селезенки и паховых лимфатических узлов при различных способах его введения в условиях экспериментального распространенного гнойного перитонита. Установлено, что использование ронколейкина в послеоперационном периоде при распространённом гнойном перитоните оказывает корригирующее действие на иммунокомпетентные клетки, изменяя их свойства регуляции миграционной активности нейтрофильных гранулоцитов. Данный эффект отмечен во всех исследуемых органах, однако наиболее выражен для иммунокомпетентных клеток периферической крови и Пейеровых бляшек. Показано, что выраженность иммуотропного действия ронколейкина зависит от способа его введения. Впервые предложен способ внутрикожного введения ронколейкина, который в дозе 3 000 МЕ/кг оказывает столь же выраженный иммуотропный эффект, как и при внутривенном, и подкожном введении в стандартных дозировках.

*Ключевые слова:* распространенный гнойный перитонит, ронколейкин, внутрикожное введение, нейтрофилы, мононуклеары, моноциты, лимфоциты.

Research is spent on 70 rabbits-males of chinchilla breed. Influence of preparation «Ronkoleukin» on neutrophil granulocytes' migratory activity under action of mitogen-induced immunocompetent blood cells, Peyer's patches, spleen and inguinal lymph nodes was studied at various ways of its introduction at an experimental widespread purulent peritonitis. It is established that usage of «Ronkoleukin» in the postoperative period at a widespread purulent peritonitis corrects action of immunocompetent cells, changing their properties of regulation of neutrophil granulocytes' migratory activity. The given effect was observed in all investigated bodies, however was most expressed for immunocompetent cages of peripheral blood and Peyer's patches. It is shown that expressiveness of «Ronkoleukin»'s immunotropic action depends on a way of its introduction. For the first time the way of intracutaneous introduction of «Ronkoleukin» which in a dose of 3 000 ME/KG renders so expressed immunotropic effect, as well as at intravenous and hypodermic introduction in standard dosages is offered.

*Key words:* widespread purulent peritonitis, «Ronkoleukin», neutrophils, mononuclear cells, monocytes, lymphocytes.

Лечение распространенного гнойного перитонита (РГП) остается одним из наиболее сложных вопросов неотложной хирургии органов брюшной полости. Актуальность и социальная значимость данной проблемы обусловлена ростом числа больных и гнойно-септических осложнений, а также стабильно высоким уровнем летальности [5, 6, 7, 11, 23, 26, 30].

Результаты лечения больных перитонитом определяются не только адекватностью выполненного оперативного вмешательства и полнотой интенсивной терапии послеоперационного периода. Во многом они зависят от состояния иммунной системы пациента и своевременно проводимой коррекции возникающих в ней нарушений [4, 13, 18, 20, 24, 25, 27]. Развитие абдоминального сепсиса с массивной бактериальной токсемией и антигенной гиперстимуляцией системы иммунитета, оперативное вмешательство, антимикробная

терапия способствуют развитию комбинированного вторичного иммунодефицита [4, 7, 9, 13, 25, 28]. В условиях РГП происходит быстрое смещение цитокинового профиля в сторону противовоспалительных иммуносупрессорных реакций [12].

Важным звеном в патогенезе иммунной дисфункции является дефицит эндогенного ИЛ-2 [8, 12, 13, 29]. Этот цитокин, продуцируемый Т-лимфоцитами, является одним из ключевых компонентов общей цитокиновой сети, поскольку участвует в формировании адекватной иммунореактивности [8, 13, 31, 32].

Известно, что заместительная иммунокоррекция препаратом рекомбинантного ИЛ-2 «Ронколейкин» при РГП способствует купированию явлений полиорганной недостаточности и снижению летальности [1-3, 15, 17, 19].

Описаны внутривенный и подкожный способы введения ронколейкина при перитоните, а также использование с данной целью метода экстракорпоральной иммунофармакотерапии [3, 9, 10, 14, 21, 22]. Внутрикожное введение, а также сравнительная оценка эффективности различных способов введения ронколейкина при перитоните в литературе не описаны.

Острая воспалительная реакция в брюшной полости с участием полиморфноядерных нейтрофилов, как клеток первой линии неспецифической иммунной защиты организма от микробной агрессии, играет одну из основных патогенетических ролей в развивающемся на местном и системном уровнях воспалительном ответе, патогенезе сепсиса и полиорганного нарушения у пациентов с РПП [7, 9, 4, 27, 29]. В связи с этим, изучение влияния способов введения ронколейкина на процессы кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных клеток с клетками острого воспаления в условиях перитонита представляется весьма перспективным.

Цель исследования – изучить иммунокорректирующее действие ронколейкина на функциональные свойства иммунокомпетентных клеток иммунных органов при различных способах введения препарата в условиях экспериментального РПП.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 70 кроликах-самцах породы шиншилла, массой 2600-3000 г. Животные были разделены на следующие группы: I – норма, n=5; II – 6-ти часовой РПП, n=5; III – контрольная (хирургическое лечение РПП), n=15; IV – хирургическое лечение РПП с внутривенным введением в послеоперационном периоде Ронколейкина, n=15. V – хирургическое лечение распространенного гнойного перитонита с подкожным введением в послеоперационном периоде препарата «Ронколейкин», n=15; VI – хирургическое лечение РПП с внутрикожным введением в послеоперационном периоде Ронколейкина, n=15.

Животные содержались в виварии, в соответствии с международными правилами GLP. Для моделирования РПП использовали микробную взвесь, состоящую из равных количеств аэробов (*E.coli*, штамм 0111 K58 НИ С 130-53) и анаэробов (*B.Fragilis*, штамм 323). Микробную взвесь вводили в брюшную полость животных стерильным шприцем из расчета 6 млрд. микробных тел на 1 кг массы кролика. Через 6 часов после введения микроорганизмов в III, IV, V и VI группах животных с целью лечения перитонита и устранения энтеральной недостаточности выполняли лапаротомию, санацию брюшной полости, декомпрессию тонкой кишки. Животных с РПП выводили из эксперимента (летальная доза нембутала) через 6 часов после заражения и на 1, 3 и 5-е сутки послеоперационного периода.

Животным IV и V групп в послеоперационном периоде (в течение 5-и суток) ежедневно два раза в сутки внутривенно капельно и подкожно соответственно вводили Ронколейкин из расчета 10 000 МЕ/кг, VI-ой группы – Ронколейкин из расчета 3 000 МЕ/кг, III группы – эквивалентный объем 0,9%-ного раствора натрия хлорида.

Для иммунологического исследования выполнялся забор венозной крови, селезенки, Пейеровых бляшек и подкожных лимфатических узлов.

Из данных органов готовились клеточные суспензии ( $10^7$ /мл) с использованием культуральной среды (КС), состоящей из среды RPMI-1640 (Sigma, США), 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин и 100 мкг/мл гентамицина. Полученные клеточные суспензии центрифугировались в двойном градиенте раствора фиккола-верографина [25]. Затем мононуклеарные лейкоциты, находящиеся в интерфазном кольце, собирали и дважды отмывали в изотоническом фосфатном буфере. В части исследований мононуклеарные лейкоциты разделяли на лимфоциты и моноциты по способности последних адгезироваться на пластиковой поверхности чашек Петри.

Митогениндуцированная цитокинпродуцирующая активность иммунокомпетентных клеток изучалась в реакции миграции нейтрофильных лейкоцитов (РМЛ) в прямом капиллярном тесте [25]. Для этого, в три ячейки круглодонного планшета для иммунологических исследований вносилось по 0,2 мл суспензии соответствующих иммунокомпетентных клеток. В первую ячейку добавляли 10 мкл фитогемагглютини-на (ФГА) (40 мкг/мл), во вторую – 10 мкл липополисахарида (ЛПС) *E. Coli* (10 мкг/мл), в третью – 10 мкл среды RPMI-1640. Планшет инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1,5 часов с последующей элиминацией митогенов путем 2-х кратного центрифугирования при 1000 об/мин в течение 3 минут. К осадку добавляли 0,1 мл ( $10^7$ /мл) суспензии нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), приготовленных на культуральной среде. НЛ получали из селезенки кроликов путем центрифугирования в двойном градиенте плотности фиккола-верографина.

Результаты РМЛ выражались в индексе миграции (ИМ), который определяли по формуле:

$$\text{ИМ} = \frac{\text{количество НЛ, мигрировавших из капилляров с митогениндуцированными клетками}}{\text{количество НЛ, мигрировавших из капилляров с интактными клетками}}$$

Статистическую обработку данных проводили с использованием электронных пакетов анализа «STATISTICA 6.0» и «Excel». Поскольку распределение признаков носило правильный характер, а дисперсии в сравниваемых группах не отличались, были использованы методы описательной статистики, t-критерий Стьюдента (уровень достоверности отличий средних значений  $p < 0,05$ ).

## Результаты и их обсуждение

В первой серии опытов изучалось влияние митоген-индуцированных ИКК (иммунокомпетентных клеток) на миграционные свойства нейтрофильных лейкоцитов у интактных животных. Установлено, что митоген-активированные (ФГА) мононуклеарные клетки вызывают подавление миграции нейтрофильных лейкоцитов. Это свойство характерно для мононуклеарных клеток всех лимфоидных органов, где индекс миграции колебался от  $0,73 \pm 0,04$  до  $0,79 \pm 0,06$ . Моноциты иммунных органов, после активации ЛПС, вызывали стимуляцию миграции нейтрофильных лейкоцитов до значений от  $1,30 \pm 0,06$  до  $1,34 \pm 0,03$ .

При экспериментальном РГП происходят изменения цитокинпродуцирующей активности иммунокомпетентных клеток различных иммунных органов при их активации митогенами ЛПС и ФГА. Эти изменения характеризуются снижением продукции фактора ингибирования миграции нейтрофильных лейкоцитов ФГА-активированными мононуклеарными клетками, ростом стимуляции миграции нейтрофильных лейкоцитов моноцитами, активированными ЛПС *E.coli*. Полученные данные позволяют полагать, что при экспериментальном перитоните наблюдаются изменения цитокинпродуцирующей активности ИКК, что, по-видимому, приводит к значительному накоплению нейтрофильных лейкоцитов в брюшной полости и участию этих клеток в развитии эксудативно-деструктивного воспаления в ней.

Проведена оценка влияния ронколейкина на функциональное состояние митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток венозной крови, Пейеровых бляшек, селезенки и периферических лимфатических узлов в условиях РГП при внутривенном, подкожном и внутрикожном способах введения Ронколейкин (Табл. 1, 2, 3, 4). Как видно из таблиц 1-4, во всех исследуемых органах на протяжении 5-и суток послеоперационного периода происходили значительные изменения миграционной активности нейтрофильных гранулоцитов. В условиях перитонита происходила отмена ингибции миграции нейтрофильных гранулоцитов ФГА-стимулированными мононуклеарными клетками крови и усиление стимулирующего действия ЛПС-(но не ФГА)-активированными моноцитами на миграцию нейтрофилов во все сроки наблюдения.

У животных, получавших ронколейкин внутривенно, наблюдалось достоверное восстановление ингибции миграции нейтрофилов крови под воздействием мононуклеарных клеток, активированных ФГА, которое было наиболее характерно для активированных ИКК крови и Пейеровых бляшек, по сравнению с аналогичными клетками периферических лимфоузлов и селезенки. Этот эффект достигал наибольших значений на 5-е сутки послеоперационного периода. При этом следует отметить, что индекс миграции нейтро-

филов на 5-е сутки достоверно ( $p=0,0003$ ) приближался к значениям, полученным у интактных животных ( $0,77 \pm 0,03$  и  $0,73 \pm 0,04$ , соответственно).

Иммунотропное действие внутривенно вводимого ронколейкина на ЛПС-активированные моноциты отмечалось уже на 1-е сутки послеоперационного периода и сохранялось во все сроки наблюдения. При этом индекс стимуляции миграции нейтрофильных лейкоцитов в крови достиг на 5-е сутки после операции  $1,28 \pm 0,11$  и не отличался от нормы. Следует отметить, что такое действие ронколейкина на функциональную активность ЛПС-активированных моноцитов отмечалось у клеток всех исследуемых иммунных органов.

При подкожном введении Ронколейкин оказывал менее выраженное действие на функциональную активность ИКК по сравнению с результатами, полученными при внутривенном введении.

Установлено, что Ронколейкин оказывал выраженное иммунотропное действие при внутрикожном введении. Эффект характеризовался повышением функциональной активности ИКК мононуклеаров при их стимуляции ФГА. В крови наблюдалось достоверное, по сравнению с внутривенным и подкожным способами введения ( $p=0,0003$ ,  $p<0,0001$  соответственно), восстановление регуляции миграционных свойств нейтрофильных лейкоцитов под влиянием ФГА-активированных мононуклеарных клеток до значений, полученных у здоровых животных. Данный эффект был наиболее характерен для ИКК крови, Пейеровых бляшек и периферических лимфоузлов, но не селезенки. Кроме этого, следует отметить, что такой иммунотропный эффект отмечался уже на 3-и сутки внутрикожного введения ронколейкина и достигал максимальных значений на 5-е сутки его применения. Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов при этом снижался с  $0,97 \pm 0,01$  до  $0,70 \pm 0,03$  в крови) и с  $0,99 \pm 0,02$  до  $0,73 \pm 0,01$  в Пейеровых бляшках.

При разделении мононуклеаров на лимфоциты и моноциты было установлено, что моноциты всех исследуемых органов после стимуляции ЛПС, но не ФГА, обеспечивали значительное повышение миграции нейтрофильных лейкоцитов во всех исследуемых органах. На фоне применения ронколейкина к 5 суткам послеоперационного периода при всех способах введения достигалось достоверное (внутривенное введение –  $p=0,006$ , подкожное –  $p=0,003$ , внутрикожное –  $p=0,001$ ) восстановление миграционных свойств нейтрофилов венозной крови под действием ЛПС-активированных моноцитов до значений, полученных у интактных животных. В то же время, значительных статистически значимых различий выраженности иммунотропного действия ронколейкина на ЛПС-активированные лимфоциты, в зависимости от способа его введения, в эксперименте не выявлено.

Таблица 1  
**Влияние способов введения ронколейкина на функциональную активность митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток крови при экспериментальном распространённом гнойном перитоните**

Клетки	Митоген	6-ти часовой перитонит (n=5)	Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов												
			Норма (n=5)	Контрольная группа			Внутривенное введение ронколейкина			Подкожное введение ронколейкина			Внутрикожное введение ронколейкина		
				1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)
Мононуклеары	ФГА	0,73 ±0,04 P1=0,006	1,01 ±0,05 P1<0,0001 P2=0,002	1,01 ±0,02 P1<0,0001 P2=0,001	0,95 ±0,06 P1=0,0002	0,93 ±0,03 P1<0,0001 P2=0,03 P3=0,009	0,87 ±0,04 P1=0,0005 P3=0,0001	0,77 ±0,03 P3=0,0003	0,95 ±0,02 P1<0,0001 P2=0,01 P3=0,02	0,92 ±0,03 P1<0,0001 P3=0,0004	0,81 ±0,02 P1=0,002 P3=0,001 P4=0,01	0,97 ±0,01 P1<0,0001 P2=0,005 P4=0,03	0,80 ±0,03 P1=0,01 P3<0,0001 P4=0,002 P5=0,0004	0,70 ±0,03 P3<0,0001 P4=0,0003 P5=0,0001	
			ЛПС	1,03 ±0,03 P1=0,005	1,02 ±0,03 P1=0,01	1,02 ±0,03 P1=0,02	0,99 ±0,03 P3=0,03	1,01 ±0,02 P1=0,004	0,99 ±0,02	0,99 ±0,01 P3=0,02	0,99 ±0,01 P1=0,03 P4=0,04	0,99 ±0,03 P1=0,008	0,97 ±0,01 P3=0,004 P5=0,03	0,99 ±0,02 P4=0,04	0,98 ±0,03 P1=0,02
Моноциты	ФГА	1,30 ±0,04 P1=0,005	1,53 ±0,12 P1=0,005	1,50 ±0,08 P1=0,001	1,53 ±0,10 P1=0,002	1,36 ±0,10 P=0,04	1,34 ±0,04 P3=0,006	0,98 ±0,01 P2=0,003 P3=0,0001	1,44 ±0,03 P1=0,0003	1,41 ±0,04 P1=0,003 P4=0,04	1,33 ±0,02 P3=0,003	1,37 ±0,03 P1=0,02 P5=0,005	1,35 ±0,04 P3=0,005 P5=0,03	1,31 ±0,02 P3=0,001	
			ЛПС	1,00 ±0,02 P1=0,0008	1,03 ±0,02 P1=0,0001	1,01 ±0,01 P1=0,0002	0,97 ±0,02 P1=0,04 P3=0,01	0,95 ±0,06 P3=0,002	0,89 ±0,01 P1=0,01 P3<0,0001	0,99 ±0,02 P1=0,006	0,96 ±0,05 P3=0,01	0,93 ±0,04 P3=0,005	1,02 ±0,02 P4=0,005 P5=0,047	0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,004	0,95 ±0,03 P3=0,005 P4=0,007
Лимфоциты	ФГА	0,93 ±0,02 P1=0,026	1,00 ±0,02 P1=0,0008	1,03 ±0,02 P1=0,0001	1,01 ±0,01 P1=0,0002	0,99 ±0,02 P1=0,04 P3=0,01	0,95 ±0,06 P3=0,002	0,89 ±0,01 P1=0,01 P3<0,0001	0,99 ±0,02 P1=0,006	0,96 ±0,05 P3=0,01	0,93 ±0,04 P3=0,005	1,02 ±0,02 P4=0,005 P5=0,047	0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,004	0,95 ±0,03 P3=0,005 P4=0,007	
			ЛПС	1,03 ±0,01 P1=0,008 P2=0,049	1,02 ±0,01 P1=0,02	1,01 ±0,02	0,99 ±0,03 P3=0,02	0,97 ±0,02 P3=0,004	0,95 ±0,02 P3=0,003	0,99 ±0,01 P3=0,003	1,00 ±0,02	1,01 ±0,03 P4=0,007	0,99 ±0,01 P3=0,001	1,01 ±0,01 P4=0,01	0,99 ±0,01 P4=0,006

Примечание. p1 – достоверно по сравнению с нормой, p2 - достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы 6-ти часовой перитонит, p3 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками контрольной группы, p4 - достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин внутривенно, p5 - достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин подкожно

Таблица 2

**Влияние способов введения ронколейкина на функциональную активность митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток Пейеровых бляшек при экспериментальном распространном гнойном перитоните**

Клетки	Митоген	6-ти часовой перитонит (n=5)	Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов												
			Норма (n=5)	Контрольная группа			Внутривенное введение ронколейкина			Подкожное введение ронколейкина			Внутрикожное введение ронколейкина		
				1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)
Моно-нуклеары	ФГА	0,85 ±0,05 p1=0,002	1,03 ±0,02 p1<0,0001 p2<0,0001	0,98 ±0,04 p1<0,0001	0,95 ±0,03 p1<0,0001	0,85 ±0,01 p1<0,0001 p3<0,0001	0,83 ±0,04 p1=0,004 p3=0,0007	0,73 ±0,07 p3<0,0001	0,99 ±0,02 p1<0,0001 p2=0,0004 p3=0,01 p4<0,0001	0,89 ±0,06 p1<0,0001 p3=0,006 p4=0,014	0,80 ±0,02 p1=0,001 p3<0,0001 p4=0,035	0,99 ±0,02 p1<0,0001 p2=0,003 p3=0,021 p4<0,0001	0,75 ±0,03 p3<0,0001 p4=0,007 p5=0,0001	0,73 ±0,01 p3<0,0001 p5<0,0001	
			0,96 ±0,03 p1=0,004	1,03 ±0,02 p1=0,0003	1,03 ±0,04 p1=0,01	1,01 ±0,03 p1=0,002	1,00 ±0,01 p1=0,0012	1,00 ±0,02 p1=0,001	1,00 ±0,02 p1=0,0003 p4=0,02	1,02 ±0,01 p1=0,0002 p3=0,03	0,99 ±0,02 p1=0,005	1,02 ±0,02 p1=0,0002 p5=0,034	1,01 ±0,01 p1=0,0002 p5=0,03	1,02 ±0,01 p1=0,0001 p4=0,001	0,98 ±0,04
Моноциты	ФГА	1,04 ±0,03	1,03 ±0,04	1,02 ±0,06 p1=0,004	1,02 ±0,01	1,04 ±0,07	0,98 ±0,03	0,99 ±0,03	1,00 ±0,04	0,99 ±0,04	1,01 ±0,02	1,01 ±0,03	0,99 ±0,01 p1=0,0001	1,01 ±0,02	
			1,33 ±0,08 p1=0,007	1,63 ±0,14 p1=0,003	1,56 ±0,06 p1=0,0006	1,40 ±0,07 p2=0,049 p3=0,015	1,41 ±0,07 p3=0,005	1,37 ±0,06 p3=0,014	1,54 ±0,05 p1=0,0008 p4=0,01	1,46 ±0,07 p1=0,02 p3=0,04	1,41 ±0,02 p1=0,049 p3=0,02	1,48 ±0,05 p1=0,007	1,39 ±0,04 p3=0,0006	1,35 ±0,03 p3=0,0029 p5=0,007	
Лимфоциты	ФГА	1,00 ±0,04	1,00 ±0,07	1,02 ±0,01	1,00 ±0,07	0,96 ±0,02 p3=0,007	0,97 ±0,01 p1=0,03 p3<0,0001	0,94 ±0,03 p3=0,002	0,97 ±0,02 p1=0,037 p3=0,047	0,99 ±0,01 p1=0,01 p3=0,01 p4=0,024	0,96 ±0,02 p3=0,005	0,98 ±0,02 p1=0,02	1,00 ±0,01 p1=0,005 p3=0,002 p4=0,0002	0,91 ±0,03 p3=0,0004 p5=0,016	
			0,96 ±0,01	0,98 ±0,03	1,04 ±0,04 p1=0,024	1,01 ±0,06	0,99 ±0,01 p1=0,006 p3=0,017	0,97 ±0,02 p3=0,002	1,00 ±0,04	0,97 ±0,02 p3=0,002	1,00 ±0,02 p1=0,004 p3=0,05	0,96 ±0,02 p3=0,0008	1,00 ±0,01 p1=0,0002	1,02 ±0,02 p1<0,0001 p4=0,003 p5=0,038	0,96 ±0,01 p3=0,0001

Примечание. p1 – достоверно по сравнению с нормой, p2 - достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы (6-ти часовой перитонит, p3 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками контрольной группы, p4 - достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин внутривенно, p5 - достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин подкожно.

Таблица 3

**Влияние способов введения ронколейкина на функциональную активность митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток периферических лимфоузлов при экспериментальном распространённом гнойном перитоните**

Клетки		Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов																																
		Митоген	6-ти часовой перитонит (n=5)	Контрольная группа			Внутривенное введение ронколейкина			Подкожное введение ронколейкина			Внутрикожное введение ронколейкина																					
				1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)																			
Моно-нуклеары	ФГА	0,73 ±0,04	0,87 ±0,03 P1=0,0002	1,03 ±0,05 P1<0,0001 P2<0,0001	1,01 ±0,03 P1<0,0001	0,74 ±0,03 P3<0,0001	1,01 ±0,04 P1<0,0001 P2<0,0001 P4=0,016	0,91 ±0,03 P1<0,0001 P3=0,003	0,81 ±0,01 P1=0,002 P3<0,0001 P4=0,001	0,98 ±0,01 P1<0,0001 P2<0,0001 P3=0,002	0,81 ±0,04 P1=0,017 P3<0,0001 P4=0,03 P5=0,002	0,77 ±0,03 P3<0,0001 P5=0,03	ЛПС	0,98 ±0,02	1,01 ±0,01 P1=0,006	1,03 ±0,05 P1=0,035 P2=0,0005	1,01 ±0,02 P1=0,016	0,97 ±0,02 P3=0,023	1,01 ±0,03 P1=0,037	0,99 ±0,02 P1=0,038	1,00 ±0,03 P3=0,026	0,99 ±0,02												
		0,98 ±0,04	0,99 ±0,02	1,00 ±0,04 P1=0,026 P2=0,027	1,03 ±0,04 P1=0,0001 P2=0,0003	1,34 ±0,03 P3=0,0003	1,37 ±0,06 P3=0,0003	1,03 ±0,02 P1=0,031 P2=0,027	1,34 ±0,01 P3<0,0001	1,43 ±0,04 P1=0,01	1,34 ±0,03 P3=0,0004	1,44 ±0,06 P1=0,011 P3=0,003		1,40 ±0,03 P1=0,04 P3=0,0005 P4=0,005	1,39 ±0,01 P3=0,006 P4=0,006	1,35 ±0,03 P2=0,015 P3<0,0001 P5=0,013	1,31 ±0,09 P3=0,005																	
Лимфоциты	ФГА	0,95 ±0,02	1,01 ±0,03 P1=0,005	1,02 ±0,04 P1=0,004	1,00 ±0,02 P1=0,022	1,04 ±0,04 P1=0,002	1,01 ±0,03 P1=0,01	0,98 ±0,01 P1=0,006 P3=0,043	1,01 ±0,02 P1=0,002	0,98 ±0,02 P3=0,017	1,00 ±0,01 P1=0,002	0,99 ±0,02 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,047	0,99 ±0,02	1,00 ±0,01 P1=0,002	1,00 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,002 P3=0,042	1,00 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,002 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	ЛПС	0,99 ±0,06	1,01 ±0,04 P1=0,006	1,02 ±0,05 P1=0,002	1,01 ±0,03 P1=0,01	1,00 ±0,01 P1=0,002	1,01 ±0,02 P1=0,003	1,00 ±0,01 P1=0,002	0,99 ±0,02 P1=0,0036	1,00 ±0,01 P1=0,002	0,99 ±0,02 P1=0,002	1,00 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,002 P3=0,042
		0,99 ±0,06	1,01 ±0,04 P1=0,006	1,02 ±0,05 P1=0,002	1,01 ±0,03 P1=0,01	1,04 ±0,04 P1=0,002	1,01 ±0,03 P1=0,01	0,98 ±0,01 P1=0,006 P3=0,043	1,01 ±0,02 P1=0,002	0,98 ±0,02 P3=0,017	1,00 ±0,01 P1=0,002	0,99 ±0,02 P3=0,042	1,00 ±0,01 P1=0,002	0,99 ±0,02 P1=0,0038	0,99 ±0,02 P1=0,002	1,00 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	0,99 ±0,02 P1=0,002	1,00 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042	0,99 ±0,01 P1=0,002	0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042		0,99 ±0,01 P1=0,001 P3=0,042											

Примечание: p1 – достоверно по сравнению с нормой, p2 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы 6-ти часовой перитонит, p3 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками контрольной группы, p4 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин внутривенно, p5 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин подкожно.

Таблица 4

**Влияние способов введения ронколейкина на функциональную активность митоген-индуцированных иммунокомпетентных клеток селезенки при экспериментальном распространном гнойном перитоните**

		Индекс миграции нейтрофильных лейкоцитов												
Клетки	Митоген	6-ти часовой перитонит (n=5)	Контрольная группа			Внутривенное введение ронколейкина			Подкожное введение ронколейкина			Внутрикожное введение ронколейкина		
			1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)	1-е сутки (n=5)	3-и сутки (n=5)	5-е сутки (n=5)
Моно-нуклеары	ФГА	0,79 ±0,06 P1=0,023	0,99 ±0,02 P2=0,002	0,97 ±0,07 P1=0,002	0,95 ±0,02 P1=0,0003	0,90 ±0,06 P1=0,018 P3=0,013	0,86 ±0,02 P1=0,036 P3=0,01	0,80 ±0,02 P3<0,0001	0,93 ±0,04 P1=0,002 P3=0,012	0,89 ±0,02 P1=0,009 P3=0,033	0,85 ±0,02 P3<0,0001 P4=0,002	0,91 ±0,03 P1=0,003 P3=0,001	0,84 ±0,01 P3=0,0029 P4=0,046 P5=0,001	
			1,03 ±0,03 P1=0,009	1,03 ±0,05 P1=0,03	1,02 ±0,02 P1=0,006	1,02 ±0,04	1,03 ±0,02 P1=0,0038	1,01 ±0,02 P1=0,016	1,02 ±0,03 P1=0,032	1,02 ±0,02 P1=0,004	1,01 ±0,02 P1=0,019	1,02 ±0,03 P1=0,01	1,02 ±0,03 P1=0,01	1,03 ±0,04 P1=0,037
Моноциты	ЛПС	1,00 ±0,02	1,01 ±0,06	1,00 ±0,03	1,01 ±0,01	1,01 ±0,02	0,99 ±0,05	0,99 ±0,02 P3=0,034	0,99 ±0,03	1,00 ±0,02	1,00 ±0,02	0,99 ±0,02	0,98 ±0,03	
			1,60 ±0,06 P1<0,0001 P2=0,0003	1,57 ±0,15 P1=0,007 P3=0,044	1,45 ±0,06 P1=0,004	1,34 ±0,13 P3=0,003	1,32 ±0,07 P3=0,011	1,31 ±0,02 P3=0,0008	1,35 ±0,02 P2=0,002 P3<0,0001	1,33 ±0,09 P3=0,015	1,32 ±0,02 P3=0,001	1,34 ±0,02 P3<0,0001	1,32 ±0,03 P3=0,006	1,32 ±0,03 P3=0,007
Лимфоциты	ФГА	0,98 ±0,03	0,99 ±0,05	1,01 ±0,01	1,01 ±0,03	1,01 ±0,02	0,98 ±0,01 P3=0,011	0,98 ±0,04	0,99 ±0,01 P4=0,044	0,98 ±0,02 P3=0,016	0,99 ±0,03	1,01 ±0,01 P5=0,004	0,99 ±0,02	
			1,03 ±0,03	1,02 ±0,06	1,01 ±0,04	1,01 ±0,04	1,01 ±0,03	1,01 ±0,01	1,00 ±0,02	0,99 ±0,01	0,99 ±0,02	0,99 ±0,01 P3=0,016	1,01 ±0,01 P5=0,014	
Лимфоциты	ЛПС	0,99 ±0,05	1,03 ±0,03	1,02 ±0,06	1,01 ±0,04	1,01 ±0,04	1,01 ±0,03	0,99 ±0,01	1,00 ±0,02	0,99 ±0,02	0,99 ±0,02	0,99 ±0,01 P3=0,016	0,99 ±0,01	
			1,03 ±0,03	1,02 ±0,06	1,01 ±0,04	1,01 ±0,04	1,01 ±0,03	1,01 ±0,01	1,00 ±0,02	0,99 ±0,01	0,99 ±0,02	0,99 ±0,01 P3=0,016	1,01 ±0,01 P5=0,014	

Примечание. p1 – достоверно по сравнению с нормой, p2 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы 6-ти часовой перитонит, p3 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками контрольной группы, p4 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин внутривенно, p5 – достоверно по сравнению с аналогичными сутками группы ронколейкин подкожно/

## Заключение

Результаты исследования указывают на наличие у ронколейкина существенного иммунотропного потенциала, реализация которого зависит от способа его введения. Отличительной особенностью предложенной иммунотерапии перитонита является методика внутрикожного введения ронколейкина. Такое применение ронколейкина в послеоперационном периоде в эксперименте позволяет корректировать влияние иммунокомпетентных клеток различных органов на миграционные свойства нейтрофильных лейкоцитов. Теоретическим обоснованием целесообразности данной методики является присутствие в коже как значительного количества регуляторных иммунокомпетентных клеток, осуществляющих трансдукцию модуляционных сигналов, так и множества лимфатических микрососудов.

Вероятно, что введенный внутрикочно ронколейкин оказывает иммунотропное действие на ИКК кожи с последующей активацией ИКК иммунных органов.

С другой стороны, можно предположить, что при внутрикожном введении препарат становится более доступным для лимфоидной ткани. Такой синергизм обеспечивает качественно иную, более быструю передачу иммунокорректирующей информации из кожи в эффекторные органы системы иммунитета. Все это в совокупности приводит к более выраженному иммунотропному действию ронколейкина, выражающемуся в возможном значительном повышении цитокин-продуцирующей активности иммунокомпетентных клеток, которые, в свою очередь, более эффективно регулируют миграционные свойства нейтрофильных лейкоцитов в очаге воспаления в брюшной полости.

Возможно, выявленные иммунотропные свойства ронколейкина позволят в клинической практике лечения перитонита максимально локализовать воспалительную реакцию в брюшной полости, посредством регуляции миграционных свойств нейтрофильных гранулоцитов на ранних этапах воспаления до развития развёрнутой картины абдоминального сепсиса.

## Список литературы

1. *Atkinns, M.B., Mier J.W* Therapeutic applications of Interleukin-2 New York: Marcel Dekker 1993; 389-408.
2. Sedlacek, H.H., Moroy T. Immune reactions. Springer-Verlag, 1995; 581.
3. *Анисимов А.Ю.* Иммунотерапия Ронколейкином в комплексном лечении больных абдоминальным сепсисом. Пособие для врачей. Казань 2004; 28.
4. *Бубнова Н.А., Егорова В.Н.* Обобщённый опыт применения Ронколейкина (рекомбинантного интерлейкина-2) в лечении хирургических заболеваний: пособие для врачей. Альтер Эго Санкт-Петербург 2010; 80.
5. *Бубнова Н.А., Петров С.В., Иванова Г.П., Панасенко О.Л., Галкина О.В* Роль Ронколейкина (интерлейкина-2) в лечении перитонита. Сб. «Современная многопрофильная клиническая больница: проблемы и перспективы». изд. СПбГМУ СПб 1995; 35-36.
6. *Гаин Ю.М. и др.* Иммунный статус при перитоните и пути его патогенетической коррекции: Руководство для врачей «Юнипресс» Минск: 2001; 256.
7. *Гостищев В.К., Афанасьев А.Н.* Перитонит – комплексное лечение и профилактика послеоперационных осложнений Материалы II Всерос. конф. хирургов. Ростов-на-Дону 2003; 10-11.
8. *Гостищев В.К., Сажин В.П., Авдоденко А.Л.* Перитонит Гэотар-Медиа М, 2002; 238.
9. *Гринев, М.В., Громов М.И., Комраков В.Е* Хирургический сепсис СПб 2001; 315.
10. *Егорова В.Н., Смирнов М.Н.* Новые возможности иммунотерапии с использованием Ронколейкина - рекомбинантного интерлейкина-2 человека Terra Medica. 1999; 2: 15-17.
11. *Ефименко Н.А., Розанов В.Е., Болотников А.И* Иммунопатогенез и концепция современной иммунотерапии перитонита у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой живота ООО «АВТОГРАФ М 2008; 302.
12. *Женило В.М., Кострюков В.К., Дударев И.В.* Экстракорпоральная иммунофармакотерапия ронколейкином при лечении больных перитонитом. Вестник интенсивной терапии. 2010; 5: 19-20.
13. *Илюкевич Г.В., Канус И.И.* Комплексная интенсивная терапия больных с острым распространённым перитонитом Учебно-методическое пособие – БелМАПО Мн. 2003; 24.
14. *Козлов В.К.* Иммунопатогенез и цитокинотерапия хирургического сепсиса Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2002; 2: 12-22.
15. *Козлов В.К.* Сепсис: этиология, патогенез, концепция современной иммунотерапии Диалект Спб 2008; 296.
16. *Козлов В.К., Лебедев М.Ф., Егорова В.Н.* Коррекция дисфункций иммунной системы ронколейкином Terra Medica. 2001; 2: 12-14.
17. *Лебедев В.Ф.* Оценка эффективности Ронколейкина в комплексной интенсивной терапии тяжёлого сепсиса. Новая альтернативная полиграфия СПб 2007; 52.
18. *Останин А.А. и др.* Изменение цитокинового баланса при развитии и утяжелении системной воспалительной реакции у больных с хирургической инфекцией. Медицинская иммунология. 2003; 3: 438-439.
19. *Останин А.А. и др.* Хирургический сепсис. Сообщение 2. Эффективность иммунотерапии рекомбинантным интерлейкином-2. Вестник хирургии.



- 2002; 4: 79.
20. *Останин А.А. и др.* Хирургический сепсис. Ч. 1. Иммунологические маркеры системной воспалительной реакции *Вестн. хир.* 2002; 3: 101-107.
  21. Отчёт о результатах клинических испытаний по оценке эффективности цитокинотерапии рекомбинантным интерлейкином-2 человека Ронколейкином® в комплексном лечении хирургических инфекций. ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск 2001; 22.
  22. *Петров С.В. и др.* Иммунокоррекция Ронколейкином у больных сепсисом и тяжёлыми формами перитонита. Материалы симпозиума «Иммуноотерапия в хирургической практике». СПб 1999; 12-17.
  23. Протоколы диагностики и лечения острых хирургических заболеваний органов брюшной полости. / Ассоциация хирургов Санкт-Петербурга. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе. СПб 2007; 58.
  24. Протоколы неотложной помощи и интенсивной терапии, рекомендованные 9-ым съездом федерации анестезиологов и реаниматологов (перитонит). Иркутск, 2004. – «Альтернативная полиграфия» СПб 2005; 47.
  25. *Савельев В.С. и др.* Абдоминальный сепсис: современная концепция и вопросы классификации *Анналы хирургии.* 1999; 6: 14-18.
  26. *Савельев В.С., Гельфанд Б.Р.* Сепсис: классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение: практическое руководство «Медицинское информационное агентство» М 2010; 352.
  27. *Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., Филимонов М.И.* Перитонит: практич. руков Литтерра М, 2006; 208.
  28. *Савельева В.С.* 80 лекций по хирургии. Литерра М, 2008; 912.
  29. *Сачек М.Г., Косинец А.Н., Адаменко Г.П.* Иммунологические аспекты хирургической инфекции *Витебск* 1994; 140.
  30. *Смирнов, В.С., Фрейндлин И.С.* Иммунодефицитные состояния – СПб 2000; 320.
  31. *Чурляев Ю.А. и др.* Характеристика некоторых компонентов системной воспалительной реакции у больных с распространённым перитонитом *Анестезиол. и реаниматол.* 2003; 2: 31-33.
  32. *Шуркалин, Б.К., Фалер А.П., Горский В.А.* Хирургические аспекты лечения распространённого перитонита *Хирургия.* 2007; 2: 24-28.

Поступила 17.12.2011 г.

#### Информация об авторах

1. Гостищев Виктор Кузьмич – д.м.н., проф., академик РАМН, Президент Ассоциации общих хирургов Российской Федерации, зав. кафедрой общей хирургии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова, председатель проблемной комиссии «Инфекция в хирургии» Межведомственного научного Совета по хирургии РАМН и Министерства здравоохранения и социального развития; e-mail: afansurg@rambler.ru
2. Косинец Владимир Александрович – к.м.н., докторант кафедры общей хирургии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова; e-mail: vkosinets@yandex.by