

Активация факторов врожденного иммунитета при искусственном кровообращении у кардиохирургических пациентов

К.С. Выхристенко, О.В. Смирнова

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Activation of the innate immunity factors in the patients after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Summary

α

γ

α

α

Ключевые слова

Keywords

Значительное количество хирургических вмешательств на сердце проводится в условиях искусственного кровообращения (ИК). ИК используют при всех внутрисердечных операциях, реконструктивных операциях на коронарном русле, а так же при некоторых оперативных вмешательствах на крупных магистральных сосудах.

Несмотря на значительный клинический опыт метод, ИК остается не безопасным. Одним из аспектов его использования является инициация общей воспалительной реакции вплоть до развития синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) [1, 2, 3].

Степень проявления ССВО варьирует, но вне зависимости от этого является потенциально опасным для пациента [4]. Генерализованный воспалительный ответ ведет к поражению органов-мишеней: легких, сердца, головного мозга, печени, почек, что в итоге может стать причиной выраженной полиорганной недостаточности в послеоперационном периоде [5].

В результате контакта крови с воздухом и чужеродными поверхностями контура аппарата искусственного кровообращения, механической травмы крови активируются гуморальные факторы и клетки система иммунитета [6]. Реперфузионное повреждение индуцирует развитие системного воспаления путем активации системы комплемента, цитокинов, молекул адгезии и тромбоцитов [7, 8, 9, 10].

Изучение механизмов развития системного воспаления после ИК необходимо для разработки способов предотвращения и коррекции осложнений [11].

Целью нашей работы была оценка изменений факторов врожденного иммунитета (цитокины, адгезины, компоненты комплемента) у кардиохирургических пациентов после использования искусственного кровообращения.

Дизайн исследования Исследование выполнено по протоколу открытого проспективного исследования, в которое были включены пациенты с заболеваниями сердца, требующими хирургического вмешательства с использованием ИК. В исследование не включали пациентов с активным инфекционным процессом, в том числе и эндокардитом, с наличием послеоперационных осложнений,

требующих повторного оперативного вмешательства, а так же с тяжелой сопутствующей патологией.

Исследование проходило на базе отделения кардиохирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница». Обследовано 15 кардиохирургических пациентов поступивших на плановое хирургическое лечение. Средний возраст пациентов составил 56,75 (52; 61,5) лет, мужчин - 10, женщин - 5. Продолжительности ИК составила 151,5 (124; 159,5) мин.

Искусственное кровообращение проводилось на аппарате Terumo Advanced Perfusion System 1. Для аппарата ИК использовался контур Sorin Group с покрытием Ph.i.s.i.o (Phosphoryl choline inert surphase).

Для первичного заполнения контура аппарата ИК использовался 10% альбумин 400 мл, 15% маннитол 300 мл, 4% раствор NaHCO_3 100 мл, 6% гидроксипропилкрахмал 400, 500 мл раствора Рингера. Интраоперационно у всех пациентов использовался метилпреднизолон в дозе 1000мг.

В послеоперационном ведении пациентов не использовались какие-то либо иммунокоррирующие препараты и процедуры.

Имунологические исследования проводили с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc. США). Для фенотипирования клеток крови на проточном цитометре использовали моноклональные антитела «Invitrogen Corporation» США. Цитокины и иммуноглобулины в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием фотометра универсального «Витязь Ф300» (Беларусь) и наборов производства ООО Цитокин, Росси и «Вектор-Бест», Россия.

Для биохимических исследований использовали наборы производства НТПК «Анализ Х» Республики Беларусь; полуавтоматический биохимический анализатор Screen Master Lab (Италия); автоматический биохимический анализатор BS-300 (Китай); спектрофотометр PV-2111 (НТЦ АО «Солар» Беларусь); денситометр ДМ2120 (НТЦ АО «Солар» Беларусь).

Забор крови проводили до ИК, на 1 и 5-6 сутки после операции. Расчет концентраций корректировали с учетом гемодилюции по формуле:

$$C = C_a * Ht_0 / Ht_a,$$

где C - скорректированное значение, C_a - актуальное значение, Ht_0 - исходный гематокрит, Ht_a - гематокрит на соответствующем этапе.

Статистическая обработка и представление данных. Полученные данные не имели ха-

рактен нормального распределения, для статистической оценки данных использовались методы непараметрической статистики. Данные представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей (Me (Q₁; Q₃)). Различия считали достоверными при вероятности $p < 0,05$ и мощности метода (β) 20%.

Развитие лейкоцитоза и палочкоядерного сдвига лейкоцитарной формулы является типичной реакцией организма на операционную травму и применение ИК. В первые сутки после операции количество лейкоцитов значительно возрастало, в среднем на 10 тыс./л (табл.1). На 5-6 сутки количество лейкоцитов крови достоверно снижалось, однако было несколько выше нормы.

В послеоперационном периоде достоверно наблюдали повышение абсолютного количества нейтрофилов, при этом абсолютное количество лимфоцитов, моноцитов оставалось практически неизменным, хотя в процентном отношении имелось достоверное снижение относительного количества лимфоцитов.

Количество гемоглобина и эритроцитов достоверно уменьшались на первые и 5-6 сутки после вмешательства, что связано с гемодилюцией, травмой эритроцитов аппаратом ИК, послеоперационным потерям по дренажам (табл.2).

Показатели биохимического анализа крови представлены в табл. 3. У всех пациентов повышался уровень глюкозы, как проявление острой стрессовой реакции на операционную травму. Обращает на себя внимание снижение уровня белка, несмотря на то, что в первичном заполнении аппарата ИК использовался альбумин. В послеоперационном периоде отмечался подъем уровня билирубина, трансаминаз, креатинина и мочевины.

По всей видимости, изменения в общем и биохимическом анализе крови свидетельствуют о тяжелой неспецифической стресс-реакции организма и могут быть проявлениями интраоперационного развития ССВО.

Абсолютное количество лимфоцитов, имеющих маркеры CD4+ и CD8+, уменьшалось практически в два раза в первые сутки после операции, а затем на 5-6 сутки стремилось к восстановлению прежних значений (табл. 4).

Динамика изменений числа клеток, несущих низкоаффинную α -цепь рецептора для интерлейкина-2 (ИЛ-2) CD25+ была аналогичной. Снижение количества клеток, экспрессирующих CD25, возможно связано со сбрасыванием рецептора и переходом его в сывороточную форму.

В то же время количество CD19+ В лимфоцитов в послеоперационном периоде достоверно не изменялось. Обнаруженное снижение CD4+, CD8+ и активированных CD25+ клеток является

Таблица 1. Изменения лейкоцитарной формулы у кардиохирургических пациентов

Показатели		До операции	После операции	
			1 сутки	5-6 сутки
Лейкоциты	абс., тыс/л	6,85 (6,1; 8,2)	16,95 (15,8; 18,15)*	11,1 (9,5; 12,35)*,**
Палочкоядерные нейтрофилы	абс.,тыс/л	0,096 (0,069; 0,152)	1,98 (1,69; 3,269)*	0,377 (0,305; 0,617)*,**
	%	1 (1; 2,5)	12 (10; 18,5)*	4 (3;5)*,**
Сегментоядерные нейтрофилы	абс.,тыс/л	3,81 (3,29; 4,99)	11,832 (11,04; 12,66)*	7,12 (6,04; 8,5)*,**
	%	59,5 (49,5; 65)	70,5 (69,5;73,5)*	68 (64; 74,5)*,**
Лимфоциты	абс.,тыс/л	2,37 (1,64; 2,78)	1,9 (1,91; 2,37)	2,1 (1,44; 2,53)
	%	33,5 (26,5; 41,5)	11 (8; 13)*	18,5 (12,5; 23)*,**
Моноциты	абс.,тыс/л	0,354 (0,268; 0,507)	0,632 (0,34; 0,99)	0,8 (0,54; 1,29)
	%	5 (3,5; 7,5)	4 (2,5; 5,5)	7,5 (5; 10)**
Эозинофилы	абс.,тыс	0,026 (0; 0,146)	0 (0)*	0,133 (0; 2,95)**
	%	0,5 (0; 2)	0 (0)*	1,5 (0; 2)**

Примечания:

1. *- различия по отношению к показателю до операции ($p < 0,05$),

2. ** - различие по отношению к показателю 1-е сутки после операции ($p < 0,05$).

Таблица 2. Динамика количества эритроцитов и гемоглобина у кардиохирургических пациентов

Показатели	До операции	После операции	
		1 сутки	5-6 сутки
Эритроциты, млн/л	4,695 (4,37; 4, 98)	3,645 (3,305; 3,88) *	3,46 (3,165; 3,730) *
Гемоглобин, г/л	141 (128,5; 143)	111 (92; 114) *	101,5 (91; 112) *

Примечание:

*- различия по отношению к показателю до операции (p<0,05),

Показатели	До операции	После операции	
		1 сутки	5-6 сутки
Билирубин, мкмоль/л	16,65 (15,1; 20,75)	34,17 (23,96; 55,45)*	17,11 (11,79; 22,54)
Белок общий, г/л	62 (57; 66,5)	53 (50; 60)*	56,5 (50,5; 59)*
Глюкоза, ммоль/л	5,58 (4,5; 6)	8,75 (7,3; 10,5)*	4,70 (4,1; 5,05)*, **
АлАТ, Ед/л	30 (25;33)	61,88 (48,03;76,52)*	39,84 (31,14; 50,39)
АсАТ, Ед/л	30 (27;24)	104,85 (87,6; 111,33)*	36,89 (31,35; 58,8)*, **
Креатинин, мкмоль/л	0,0895 (0,0855; 0,1)	0,153 (0,124; 0,169)*	0,123 (0,104; 0,138)**
Мочевина, ммоль/л	7,15 (5,4; 8,55)	9,55 (9,24; 13,91)*	9,05 (6,97; 13,01)

Примечания:

1. * - различия по отношению к показателю до операции (p<0,05),

2. ** - различие по отношению к показателю 1-е сутки после операции (p<0,05).

Показатели	До операции (кл/мкл)	После операции	
		1 сутки (кл/мкл)	5-6 сутки (кл/мкл)
CD4+	1008,5 (790,2; 1505,2)	597,6 (265; 924) *	983,7 (770,9; 1327,4) **
CD4+CD25+	251,5 (161,6; 348,5)	100,8 (54,4; 243,9) *	162,6 (115,9; 229) **
CD8+	884,6 (442,4; 1015,9)	464,8 (203,4; 720,9) *	539,4 (244,5; 822,3) **
CD8+CD25+	94,2 (22; 206,3)	26 (0; 80) *	53,8 (14,22; 78,2)
CD25+	339,1 (208,1; 632,8)	166 (85,4; 427,9) *	214,4 (123,6; 290,4) **
CD19+	58,8 (42,8; 164,4)	46,8 (0; 135,2)	65,3 (0; 143,6)

Примечания:

1. * - различия по отношению к показателю до операции (p<0,05),

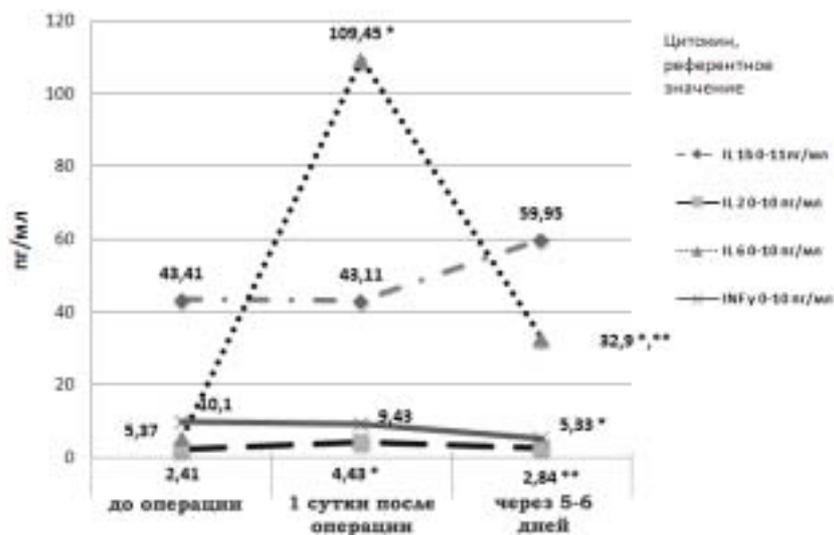
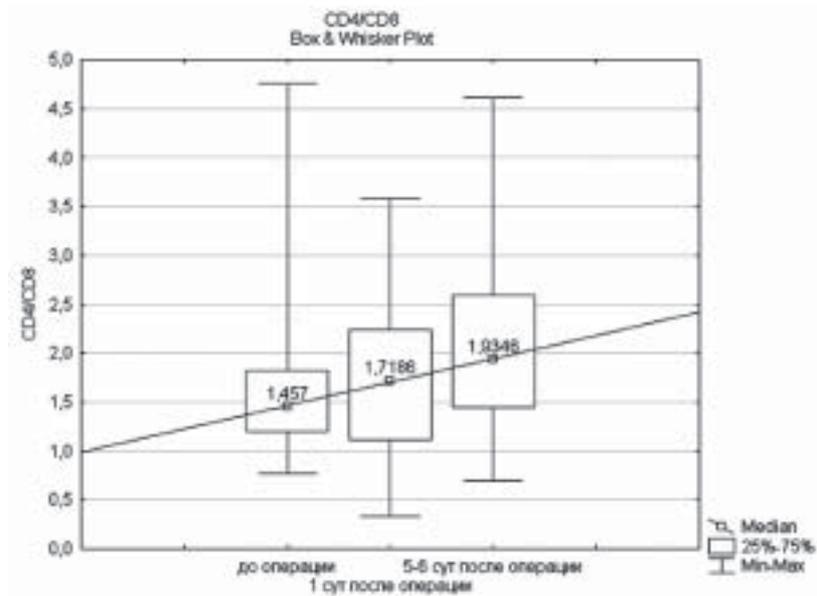
2. ** - различие по отношению к показателю 1-е сутки после операции (p<0,05).

ся неблагоприятным фактором для послеоперационного периода пациентов.

В соотношении CD4/CD8 достоверно не выявлено отличий, однако наблюдалась тенденция к повышению его уровня, что может свидетельствовать о предрасположенности к развитию аутоиммунного повреждения (рис.1).

Уровень цитокинов у обследованных нами пациентов изменялся следующим образом: на первые сутки после операции наблюдали резкое повышение содержания ИЛ-6 и ИЛ-2 в сыворотке крови, которое к 5-6 суткам снижалось до нормы (рис. 2).

В то же время оперативное вмешательство с ИК не привело к изменению уровня ИЛ-1b в



Примечания:

- *- различия по отношению к показателю до операции ($p < 0,05$),
- ** - различие по отношению к показателю 1-е сутки после операции ($p < 0,05$).

γ

сыворотке крови. Концентрация этого провоспалительного цитокина была высокой как до операции, так и весь период наблюдения за пациентами и превышала референтные значения в 4 раза.

Количество IFN-γ в сыворотке крови достоверно снижалось к 5-6 дню после опера-

ции практически в 2 раза при исходном значении близком к верхней границе референтного значения.

Характер изменений цитокинового профиля указывает на развитие системного воспалительного ответа, при некотором снижении иммунорегуляции интерфероном γ.

Изменение уровня С3 и С4 компонентов комплемента в сыворотке крови представлено в таблице 5. Содержание С3 компонента комплемента в сыворотке крови значимо возрастало в первые сутки после операции и оставалось высоким на 5-6 сутки после операции. Статистически значимых различий количества С4 компонента комплемента не выявлено.

Рецепторы, связывающие С3 и С4 компоненты комплемента на лейкоцитах CR3 (CD18+CD11b+)

и CR4 (CD18+CD11c+) практически не определялись как до операции, так и в послеоперационный период (табл.6).

Увеличивался уровень лейкоцитарных адгезинов α M(CD11b) α X(CD11c) на первые сутки послеоперационного периода, затем на 5-6 сутки он стремился к дооперационным значениям (табл.6). Уровень CD18 по сравнению с исходными показателями не изменялся. Как известно, связывание лейкоцитарных и эндотелиальных

Показатели	До операции, (г/л)	После операции	
		1 сутки, (г/л)	5-6 сутки, (г/л)
С3	430,05 (325,18; 561,95)	1039,7 (829,67;1111,93) *	1123,35 (938,67; 1258,5) *
С4	430,05 (345,83; 549,66)	559,1 (419,88; 709)	483,23 (389,68; 549,42)

Примечание:

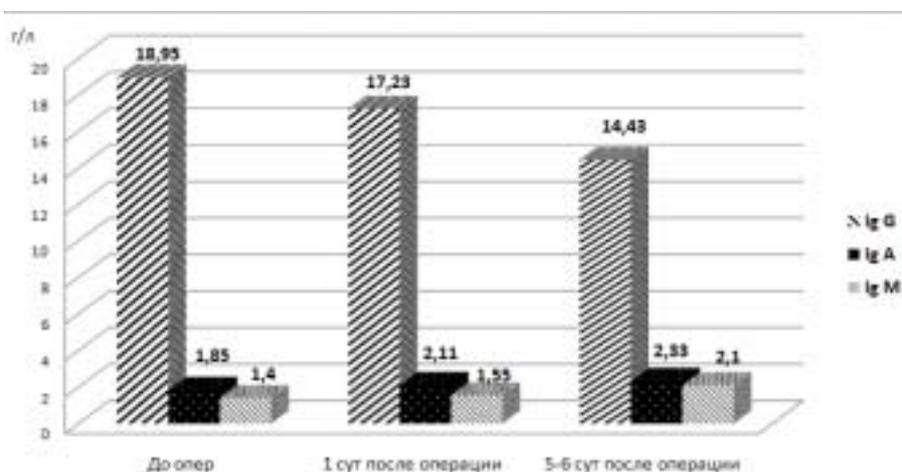
*- различия по отношению к показателю до операции (p<0,05).

Показатели	До операции, (кл/мкл)	После операции	
		1 сутки, (кл/мкл)	5-6 сутки, (кл/мкл)
CR3 (CD18+CD11b+)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
CR4 (CD18+CD11c+)	0 (0; 16,4)	0 (0;0)	0 (0; 25,2)
α M(CD11b)	1353 (972,4; 1734,6)	2996,2 (1854; 4065,6) *	1358,8 (978,5; 2117,5) **
α X(CD11c)	2153,5 (343,2; 3801,9)	2988,8 (1932; 5335,2) *	1668,6 (1082,9; 4370,8) **
β 2(CD18)	31,2 (11,8; 45,5)	0 (0; 406,4)	43 (0; 342)

Примечания:

1. *- различия по отношению к показателю до операции (p<0,05),

2. ** - различие по отношению к показателю 1-е сутки после операции (p<0,05).



адгезинов обеспечивает начальный этап их миграции через стенку сосуда – «роллинг» эффект (качение, перекачивание). Сосуды расширяются, и лейкоциты мигрируют между эндотелиальными клетками. В результате в очаге воспаления накапливаются лейкоциты всех типов, которые вследствие неспецифичности действия повреждающих цитокинов и ферментов повреждают собственные ткани [12, 13].

Нами исследованы уровни иммуноглобулинов классов М, G, А. Отмечалось повышение исходного уровня IgG (18,95 (14,9; 20,8) г/л) и тенденция к его понижению через 5-6 дней после операции (14,43 (9,96; 19,04) г/л), (рисунок 3). Статистически значимых отличий уровня иммуноглобулинов не получено.

1. У кардиохирургических пациентов в послеоперационном периоде наблюдали повышение, как абсолютного количества нейтрофилов, так и уровня адгезинов α M(CD11b) α X(CD11c), что, вероятно, опосредует повы-

шенную миграцию лейкоцитов в ткани, вызывая воспалительные реакции и повреждение.

2. Содержание С3 компонента комплемента в сыворотке крови возрастало в первые сутки после операции, его уровень оставался высоким и на 5-6 сутки после операции, что указывает на индукцию активации комплемента у кардиохирургических пациентов с использованием ИК.
3. Обнаружены признаки иммунодефицита в послеоперационном периоде, а именно, уменьшение числа лимфоцитов CD4+ и CD8+, снижение CD25+ клеток, а так же снижение уровня IFN- γ в сыворотке крови.
4. Характер изменений цитокинового профиля указывает на развитие системного воспалительного ответа, при некотором снижении иммунорегуляции интерфероном γ . Уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-2 в сыворотке крови были резко повышены в первые сутки после операции, а содержание ИЛ-1b в сыворотке крови было выше референтных значений как до операции, так и весь период наблюдения за пациентами.

Литература

1. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, et al. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2000; 64: 1198–1204.
2. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1993; Feb, 55(2): 552–559.
3. Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C. et al. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1—mechanisms of pathogenesis. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia.* 2009; 23: 223–231.
4. Rubens FD, Nathan H, Labow R. et al. Effects of methylprednisolone and a biocompatible copolymer circuit on blood activation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2005; Feb, 79(2): 655–65.
5. Cameron D. Initiation of white cell activation during cardiopulmonary bypass: cytokines and receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1996; 27(1, supplement): S1–S5.
6. Asimakopoulos G. Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion* 1999; 14: 269–277.
7. Cremer J, Martin M, Redl H. et al. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1714–1720.
8. Boylan JF, Cheng DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery. *Anesthesiology* 2002; 97: 215–252.
9. Landis C. Pharmacologic strategies for combating the inflammatory response. *The Journal of extra-corporeal technology.* 2007; 39: 291–295.
10. Шебеко В.И., Родионов Ю.Я. Ангиотензин II и «сигналы опасности» для иммунной системы. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2007; №2: 76–83.
11. Durandy Y Minimizing Systemic Inflammation During Cardiopulmonary Bypass in the Pediatric Population. *The International Journal of Artificial Organs* 2014; 38: 11–18.
12. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство М.: Мед.лит, 2009, 464 с.
13. Laudanna C, Bolomini-Vittori M. Integrin activation in the immunesystem. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 2009; 1: 116–127.

Сведения об авторах:

Выхристенко Кирилл Сергеевич, ассистент кафедры госпитальной хирургии Витебского государственного медицинского университета. 210602 Беларусь, Витебск, пр-т Фрунзе, 27. Тел.: +37529-7117445; Эл. почта: vykiserg@gmail.com

Поступила 14.01.2014 г.