

ПРОЗАПАЛЬНІ ЦИТОКІНИ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ЗІ СКЛАДНИМИ ВРОДЖЕНИМИ ВАДАМИ СЕРЦЯ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ АУТОЛОГІЧНОЇ ПУПОВИННОЇ КРОВІ ТА КОМПОНЕНТІВ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ

¹Г.М. Воробйова, ¹Я.В. Ткаченко, ¹В.А. Жовнір, ²Л.Ф. Яковенко, ¹К.С. Часовський,
¹О.М. Федевич, ¹І.О. Трет'якова, ²Л.М. Капустян, ²Л.Л. Сидорик, ¹І.М. Ємець

¹ДУ Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії
МОЗ України, ²Інститут молекулярної біології та генетики НАН України (Київ)

Досліджено особливості продукції прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-8) та анти-Нсп60 реактивності у новонароджених зі складними ВВС при хірургічній корекції вади з використанням аутологічної пуповинної крові та компонентів донорської крові.

У новонароджених зі складними ВВС до операції сироватковий рівень ІЛ-8 був вдвічі вищим порівняно з контролем, на 1 добу рівні ІЛ-8 та ФНП- α різко зростали, у подальшому значно знижувались, проте на 8-му добу (період спостереження) залишались вищими за показники контролю. У пацієнтів, яким переливали аутологічну пуповинну кров, встановлено кореляцію між рівнем ФНП- α у сироватці крові (8-а доба) та терміном перебування їх у стаціонарі ($r=-0,77$, $p<0,05$); у пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, така кореляція не спостерігалась ($r=-0,27$). У пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, встановлено кореляцію між рівнем ФНП- β та анти-Нсп60 антитіл (8-а доба, $r=-0,76$, $p<0,05$).

Ключові слова: пуповинна кров, вроджені вади серця, ФНП- α , ІЛ-8, анти-Нсп60 антитіла

У новонароджених зі складними вродженими вадами серця (ВВС), як було встановлено нами раніше [1], спостерігається дисфункція імунної відповіді (зниження вмісту Т- та В-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-супресорів поєднувалось зі зростанням сироваткових рівнів IgA та IgM, циркулюючих імунних комплексів, прозапальних цитокінів, показників реакції бласттрансформації із серцевим антигеном). Підвищений рівень прозапальних цитокінів у сироватці пуповинної крові новонароджених зі складними ВВС, на думку авторів, є реакцією на перинатальну гіпоксію та зумовлює клінічний стан пацієнта. За даними О.І. Артеменко (2010), у дітей 1-го року життя з ВВС спостерігалась підвищена експресія прозапальних цитокінів (ІЛ-1 та ФНП- α) у лімфоцитарно-моноцитарній фракції крові, що свідчить про їх залучення у патогенез уже на ранніх стадіях захворювання [2]. Дослідженню прозапальних цитокінів у дітей з ВВС після хірургічної корекції вади з використанням апарату штучного кровообігу присвячено значну кількість робіт, проте в основному розглядаються пацієнти 1 року життя, термін спостереження становить 1–4 доби, до того ж результати цих робіт досить суперечливі [3, 4]. Періоду новонародженості присвячено одиничні роботи [4, 5, 6], а дані стосовно продукції прозапальних цитокінів у післяопераційний період при застосуванні у пацієнтів аутологічної пуповинної крові відсутні.

У літературі висловлюється думка, що одним із активаторів продукції прозапальних цитокінів може бути білок теплового шоку 60 (heat shock protein 60, Нсп60), молекулярний шаперон, який виконує ряд важливих функцій (забезпечує правильне згортання мітохондріальних білків, попереджає їх агрегацію, у цитоплазмі виконує антиапоптичну

функцію) [7, 8]. На клітинній поверхні кардіоміоцитів Hsp60 експресується лише після дії стресових факторів, у тому числі при гіпоксії [7] та хірургічному втручанні [9]. Після хірургічного втручання підвищений вміст даного білка спостерігається також у циркуляції [9]. Нещодавно було експериментально показано, що моноклональні анти-Hsp60 антитіла здатні підсилювати запальні реакції, викликані екстрацелюлярним Hsp60, у тому числі продукцію прозапальних цитокінів (ФНП- α та ІЛ-8) [10].

Метою даної роботи було дослідження особливостей продукції прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-8) та анти-Hsp60 антитіл у новонароджених зі складними ВВС при хірургічній корекції вади з використанням аутологічної пуповинної та компонентів донорської крові, а також встановлення можливого взаємозв'язку між досліджуваними показниками.

Матеріали і методи досліджень. Новонароджені з транспозицією магістральних судин, яким проводили операцію артеріального переключення з використанням апарату штучного кровообігу (АШК), були розподілені на 2 групи. Перша група – 9 новонароджених, при хірургічному лікуванні застосовували аутологічну пуповинну кров, діагноз встановлено пренатально, операція проводилась у перші 2–6 годин після народження; 2 група – 11 новонароджених, при хірургічному лікуванні використовували компоненти донорської крові, діагноз встановлено постнатально, операція проводилась через 3–7 днів після народження. Контрольну групу склали 20 клінічно здорових новонароджених. Дослідження вмісту ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-8 та анти-Hsp60 антитіл у сироватках пуповинної та периферичної крові новонароджених проводили у динаміці – до операції, на першу, четверту та восьму добу після операції.

Рівні ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-8 визначали методом ELISA (фірма Bioscience, Австрія).

Загальний аналіз крові проводили на аналізаторі «ABX PENTRA 60» (Франція), підрахунок лейкоцитарної формули крові здійснювали за загальноприйнятою методикою.

Рівень анти-Hsp60 антитіл визначали методом ELISA з модифікаціями [11]. Як антиген використовували рекомбінантний білок GroEl *E.coli* (прокаріотний гомолог Hsp60 людини). Одержання та очищення рекомбінантного білка GroEl *E.coli* проводили за розробленою методикою [12].

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакету програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Результати представлено у вигляді середніх значень (m) із вказівкою на стандартне відхилення (sd). Для порівняння середніх значень досліджуваних груп використовували U-критерій Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-test).

Результати досліджень та їх обговорення. Результати дослідження продукції прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-8) у новонароджених зі складними ВВС у динаміці наведено у табл. 1.

До операції у пацієнтів обох груп сироваткові рівні ІЛ-8 були вдвічі вищими порівняно з контролем ($p < 0,05$), сироваткові рівні решти досліджуваних прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1 β) знаходились у межах показників контрольної групи. Підвищення продукції ІЛ-8 у новонароджених з ВВС, очевидно, є реакцією на перинатальну гіпоксію. На 1 добу після операції спостерігалось різке зростання рівнів ФНП- α та ІЛ-8 порівняно з контролем ($p < 0,05$ та $p < 0,001$) теж в обох групах обстежених. Вміст ФНП- α у сироватці крові збільшувався у 20 та 16 разів, а ІЛ-8 – у 4,5 та 5,3 рази відповідно у пацієнтів 1 та 2 груп. У подальшому продукція даних цитокінів значно знижувалась порівняно з 1-ю добою, проте залишалась достовірно вищою відносно контролю протягом всього періоду спостереження. На 8 добу (період спостереження) рівень ФНП- α був вищим показників контролю у пацієнтів 1-ї групи у 7 разів ($p < 0,05$), у пацієнтів 2-ї

Сироваткові рівні прозапальних цитокінів у новонароджених зі складними вродженими вадами серця

| Показники | До операції | 1 доба після операції | 4 доба після операції | 8 доба після операції | Норма (новонароджені) |
|--|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ФНП-α, (пг/мл) | | | | | 7,35 \pm 4,4 |
| 1 група | 9,78 \pm 3,98 | 151,24 \pm 144,99* | 26,51 \pm 19,47* | 52,91 \pm 43,74* | |
| 2 група | 38,56 \pm 61,75 | 120,59 \pm 44,64* | 21,99 \pm 27,15* | 39,54 \pm 47,97* | |
| ІЛ-1β (пг/мл) | | | | | 3,43 \pm 0,39 |
| 1 група | 3,77 \pm 0,4 | 3,63 \pm 0,42 | 4,1 \pm 1,46 | 3,9 \pm 0,53* | |
| 2 група | 3,56 \pm 0,3 | 4,03 \pm 0,71 | 4,16 \pm 1,12 | 3,7 \pm 0,8 | |
| ІЛ-8 (пг/мл) | | | | | 12,54 \pm 3,8 |
| 1 група | 21,22 \pm 6,98* | 56,7 \pm 23,94** | 25,99 \pm 8,39* | 48,28 \pm 49,37** | |
| 2 група | 26,1 \pm 14,39* | 65,98 \pm 36,89* | 42,73 \pm 34,59* | 76,0 \pm 146,37** | |

*- різниця статистично достовірна порівняно з контролем, $p < 0,05$

** - різниця статистично достовірна порівняно з контролем, $p < 0,001$

групи – у 5,5 разів ($p < 0,05$), рівень ІЛ-8 був вищим контролю у 3,9 рази ($p < 0,05$) та 6 разів ($p < 0,001$) відповідно. Тобто в післяопераційному періоді продукція ФНП- α була вищою порівняно з контролем у пацієнтів, яким переливали аутологічну пуповинну кров, а продукція ІЛ-8 – у пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, до того ж у пацієнтів 2-ї групи сироватковий рівень ІЛ-8 зростав порівняно як з його доопераційним рівнем, так і з його рівнем на 1 добу після операції. Як свідчать дані, наведені у табл. 1, рівні ІЛ-1 β на 8 добу у сироватці пацієнтів 1-ї групи дещо перевищували контрольні ($p < 0,05$), тоді як у пацієнтів 2-ї групи знаходились у межах контролю. Слід зазначити, що не було виявлено статистично достовірної різниці за досліджуваними показниками (сироваткові рівні ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-8) між двома групами обстежених пацієнтів протягом усього періоду спостереження.

У пацієнтів, яким переливали аутологічну пуповинну кров, встановлено кореляцію між рівнем ФНП- α у сироватці на 8 добу та терміном їх перебування у стаціонарі ($r = -0,77$, $p < 0,05$), у пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, такої кореляції не спостерігалось ($r = -0,27$).

Як відомо, ФНП- α – багатофункціональний цитокін, який синтезується в основному моноцитами та макрофагами і впливає на різні типи клітин, зумовлює секрецію інших прозапальних цитокінів, хемокінів, NO, реактивних форм кисню, простагландинів, лейкотрієнів, молекул адгезії, підсилює ріст лімфоїдної тканини. Тобто цей прозапальний цитокін здійснює сильний сфокусований вплив, приваблюючи в зону запалення нейтрофіли, змушуючи їх секретувати „запальний коктейль”, що сприяє подоланню причин запалення. ФНП- α індукуює апоптоз активованих клітин, що не дозволяє їм спричинити пошкодження тканин у місці запалення. Крім того, ФНП- α бере участь у процесах відновлення тканин, пошкоджених у результаті запалення. ІЛ-8 належить до групи хемокінів, основна властивість яких полягає у забезпеченні хемотаксису в зоні запалення різних

типів клітин – нейтрофілів, моноцитів, еозинофілів, Т-клітин. Він має виражені прозапальні властивості, викликаючи експресію молекул міжклітинної адгезії і підсилюючи прилипання нейтрофілів до ендотеліальних клітин і субендотеліальних матричних білків. Підвищена продукція прозапальних цитокінів, яка спостерігається в післяопераційному періоді у пацієнтів зі складними ВВС обох груп, на нашу думку, є адекватною відповіддю організму на хірургічне втручання. Необхідно враховувати, що запальний процес є природним механізмом загоєння ран та відновлення порушеної в процесі операції цілісності організму.

При дослідженні анти-Нсп60 імунореактивності раніше нами було встановлено, що у пацієнтів, яким переливали аутологічну пуповинну кров, рівень анти-Нсп60 антитіл знаходився в межах показників контролю як до операції, так і після неї (період спостережен-

Таблиця 2

Клінічні показники у анти-Нсп60 позитивних та анти-Нсп60 негативних новонароджених зі складними вродженими вадами серця, яким переливали компоненти донорської крові

| Показники | Анти-Нсп60-позитивні сироватки (n=4) | Анти-Нсп60-негативні сироватки (n=6) | Норма (новонароджені) |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Рівень анти-Нсп60 антитіл, 8 доба після операції (OD_{405 нм}) | 0,83±0,09* | 0,2±0,146 ** | 0,219±0,164 |
| Термін перебування у стаціонарі після операції (дні) | 20,3±5,68 | 17,83±4,79 | - |
| Гемоглобін, 8 доба після операції (г/л) | 117,3±17,95 | 127,14±25,98 | 160-210 г/л |
| Лейкоцити | 14,35±2,89 | 17,73±4,28 | 14-21 · 10 ⁹ |
| Еритроцити | 4,2±0,9 | 4,1±0,77 | 4-6,5 · 10 ⁹ |
| Тромбоцити | 374,5±57,99 | 367,57±188,22 | 180-400 тис. |
| Паличкоядерні | 4,0±2,94 | 11,5±9,16 | 1-6% |
| Сегментоядерні | 39,0±28,54 | 34,86±11,4 | 35-70% |
| Лімфоцити | 33,0±14,28 | 29,3±17,24 | 18-40% |
| Моноцити | 11,0±0,82 | 12,29±5,09 | 2-9% |
| Еозинофіли | 5,75±4,19 | 5,14±2,73 | 0.5-5% |
| ШОЕ | 40,0±0,0 | 18,0±18,5 | 1-20мм |
| ФНП-α (8 доба) | 10,4±2,46 | 87,56±50,09*;** | 7,35±4,4пг/мл |
| ІЛ-1β | 4,06±1,16 | 3,43±0,31 | 3,43±0,385 пг/мл |
| ІЛ-8 | 41,04±34,5* | 127,74±206,87* | 12,54±3,8 пг/мл |

* - p<0,05 порівняно з контролем

** - p<0,05 порівняно з підгрупою анти-Нсп60 позитивних пацієнтів

ня 8 діб), тоді як у пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, до операції виявлено одну сироватку, антитілопозитивну до Hsp60, а у післяопераційний період (8-а доба) – чотири анти-Hsp60 позитивні сироватки (4/10, 40%). У даному дослідженні встановлено кореляцію між рівнем ФНП-6 та анти-Hsp60 антитіл на 8-у добу в пацієнтів, які отримували компоненти донорської крові ($r=-0,76$, $p<0,05$). Результати досліджень клінічних показників у антитілопозитивних та антитілонегативних до Hsp60 пацієнтів 2-ї групи наведено у табл. 2. На нашу думку, важливим було проведення порівняльного аналізу між підгрупами за рівнем прозапальних цитокінів та показниками загального аналізу крові. Слід зазначити, що між двома підгрупами виявлено статистично достовірну різницю за рівнем ФНП- α ($p=0,034$): у анти-Hsp60 позитивних пацієнтів на 8-у добу після операції рівень ФНП- α знаходився в межах норми, тоді як у анти-Hsp60 негативних пацієнтів, як і у пацієнтів, яким переливали аутологічну пуповинну кров, даний показник був статистично достовірно вищим порівняно з контролем ($p=0,02$). За клінічними показниками між даними підгрупами не виявлено достовірних відмінностей, проте в анти-Hsp60 позитивних пацієнтів спостерігалась тенденція до більш тривалого перебування у стаціонарі, а також більш високі показники ШОЕ на 8 добу порівняно з анти-Hsp60 негативними пацієнтами.

Таким чином, одержані результати підтверджують висловлене нами раніше припущення про безпечність та ефективність використання аутологічної пуповинної крові неонатальній кардіохірургії порівняно з компонентами аллогенної донорської крові.

Висновки

1. У пацієнтів, яким переливали аутологічну пуповинну кров, встановлено кореляцію між рівнем ФНП- α у сироватці на 8 добу та терміном їх перебування у стаціонарі ($r=-0,77$, $p<0,05$); у пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, такої кореляції не спостерігалось ($r=-0,27$).
2. У пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, встановлено кореляцію між рівнем ФНП-6 та анти-Hsp60 антитіл на 8 добу після операції ($r=-0,76$, $p<0,05$).
3. Між анти-Hsp60 позитивними та анти-Hsp60 негативними пацієнтами, яким переливали компоненти донорської крові, виявлено статистично достовірну різницю за рівнем ФНП- α ($p=0,034$): у анти-Hsp60 позитивних пацієнтів на 8 добу після операції рівень ФНП- α знаходився в межах показників контролю, тоді як у анти-Hsp60 негативних пацієнтів, як і у пацієнтів, яким переливали аутологічну пуповинну кров, даний показник був статистично достовірно вищим порівняно з контролем ($p=0,02$).
4. Застосування пуповинної крові при хірургічній корекції вади з використанням АШК не супроводжується пригніченням імунної відповіді організму новонароджених.

Література

1. Ємець І.М., Воробйова Г.М., Руденко Н.М та ін. Цитокиновий профіль при складних вадах серця у новонароджених // Щорічник наукових праць Асоціації серцево-судинних хірургів України. Серцево-судинна хірургія. – 2010. – Вип.18. – С. 175–179.
2. Артеменко О.И. Клинико-биохимические и иммунологические особенности развития легочной гипертензии при врожденных пороках сердца у детей раннего возраста // Автореф. ...диск. канд. мед. наук – М., 2010. – 18 с.
3. Струнин О.В., Сенников С.В., Князькова Л.Г. и др. Цитокиновый профиль при корекции врожденных пороков сердца в условиях эксракорпоральной перфузии у де-

- тей первого года жизни // Анестезиология, реаниматология и перфузиология. – 2005. – №1. – С. 49–52.
4. Alcaraz A., Manzano L., Sancho L., Vigil M., Esquivel F., Maroto E., Reyes E., Alvarez-Mon M. Different proinflammatory cytokine serum pattern in neonate patients undergoing open heart surgery. Relevance of IL-8 // J.Clin.Immunol. – 2005. – Vol. 25. – № 3. – P. 238–245.
 5. Hovels-Gurich H., Vazquez-Jimenez J., Silvestri A., Schumacher K., Minkenberг R., Duchateau J., Messmer B., von Bemuth G., Seghaye M. Production of proinflammatory cytokines and myocardial dysfunction after arterial switch operation in neonates with transposition of the great arteries // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2002. – Vol. 124. – № 4. – P. 811–820.
 6. Appachi E., Mossad E., Mee R., Bokesch P. Perioperative serum interleukins in neonates with hypoplastic left-heart syndrome and transposition of the great arteries // J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. – 2007. – Vol. 21. – № 2. – P. 184–190.
 7. Gupta S., Knowlton A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – P. 2727–2733.
 8. Gupta S., Knowlton A. Hsp60, Bax, apoptosis and the heart // J. Cell. Mol. Med. – 2005. – Vol. 9. – № 1. – P. 51–58.
 9. Mandal K., Jahangiri M., Mukhin M., Poloniecki J., Camm J., Xu Q. Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation // Circulation. – 2004. – Vol. 110. – P. 2588–2590.
 10. Yokota S., Minota S., Nobuhiro F. Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors // Intern. Immun. – 2006. – Vol. 18. – P. 573–580.
 11. Vigontina O., Efimenko O., Yakovenko L., Kiyamova R., Filonenko V., Gout I., Ros N., Kosey N., Tatarchuk T., Sidorik L., Matsuka G. Chaperon HSP-60 as autoantigen in development of dyshormonal breast diseases // Экспер. онкология. – 2002. – Vol. 24. – P. 112–115.
 12. Kapustian L., Kuyamova R., Gryshkova V., Terentiev A., Sidorik L. Obtaining recombinant chaperon GroEl and its immunological cross-reactivity with Hsp60 // Biopolym. Cell. – 2006. – Vol. 22. – № 2. – P. 117–121.

ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ СО СЛОЖНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АУТОЛОГИЧНОЙ ПУПОВИННОЙ КРОВИ И КОМПОНЕНТОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

**А.М. Воробьева, Я.В. Ткаченко, В.А. Жовнир, Л.Ф. Яковенко, К.С. Часовский, О.М. Федевич,
И.О. Третьякова, Л.Л. Сидорик, Л.М. Капустян, И.Н. Емец**

Исследованы особенности продукции провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8) и анти-Hsp60 реактивности у новорожденных со сложными ВПС при хирургической коррекции порока с использованием аутологичной пуповинной и компонентов донорской крови.

У новорожденных со сложными ВПС до операции сывороточный уровень ИЛ-8 был в два раза выше по сравнению с контролем, на первые сутки уровни ИЛ-8 и ФНО- α резко возрастали, в дальнейшем значительно снижались, однако на 8-е сутки (период наблюдения) оставались выше показателей контроля. У пациентов, которым переливали аутологичную пуповинную кровь, установлена корреляция между уровнем ФНО- α в сыворотке крови (8-е сутки) и сроком пребывания в стациона-

ре ($r=-0,77$, $p<0,05$); у пациентов, которым переливали компоненты донорской крови, корреляция не наблюдалась ($r=-0,27$). У пациентов, которым переливали компоненты донорской крови, установлена корреляция между уровнем ФНО- α и анти-Hsp60 антител (8-е сутки после операции, $r=-0,76$, $p<0,05$).

Ключевые слова: пуповинная кровь, врожденные пороки сердца, ФНО- α , ИЛ-8, анти-Hsp60 антитела.

PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN NEONATES WITH COMPLEX CONGENITAL HEART DEFECTS AFTER AUTOLOGIC UMBILICAL CORD BLOOD AND DONOR BLOOD COMPONENTS TRANSFUSION

G. Vorobyova, Y. Tkachenko, V. Zhovnir, L. Yakovenko, K. Chasovskyi, O. Fedevich, I. Tretyakova, L. Sidoryk, L. Kapustian, I. Yemets

The levels of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-8) and anti-Hsp60 antibodies in newborns were identified using autologic umbilical cord blood (AUCB) or donor blood components transfusion after heart cardiac surgery.

Patient's sera levels of IL-8 before surgery were twice higher in comparison with control. Patient's sera levels of TNF α and IL-8 were significantly increased in comparison with control group levels on the 1st day after surgery. Levels of these cytokines were sufficiently decreased, but still remained higher in comparison with control group on the 8th postoperative day. Correlation between levels of TNF- α (8th postoperative day) and duration of hospitalization of newborns which received autologic umbilical cord blood transfusion ($r=-0,77$, $p<0,05$) was defined. No any correlations were observed in newborns with transfusion of components of allogenic donor blood ($r=-0,27$). Correlation between levels of TNF- α and anti-Hsp60 antibodies in patients with transfusion of components of allogenic donor blood ($r=-0,76$, $p<0,05$) on the 8th day after surgery was established.

Key words: cord blood, congenital heart defects, TNF- α , IL-8, anti-Hsp60 antibodies