**ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАТА НАТРИЯ НА ПРОТИВОИНФЕКЦИОННУЮ ЗАЩИТУ И КРОВЕТВОРЕНИЕ У ПОСТРАДАВШИХ С ПОЛИТРАВМОЙ (РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ПРОСПЕКТИВНОЕ ДВОЙНОЕ СЛЕПОЕ ПЛАЦЕБО КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

**пивоварова л.п., громов м.и., Тулупов а.н., лапшин В.Н., осипова И.В., арискина О.Б., никитин А.В., малышев М.Е., маркелова Е.В.**

*ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой*

*помощи им. И.И. Джанелидзе», г. Санкт-Петербург, Россия*

Политравма сопровождается кровопотерей, обширными повреждениями тканей и развитием системного воспаления, которые создают повышенную нагрузку на иммунную и кроветворную системы в силу утраты части клеточных элементов и последующего их повышенного потребления в процессах противоинфекционной защиты и репарации. Недостаточные резервы организма для восстановления перечисленных нарушений создают предпосылки для развития различного рода осложнений, влияющих на длительность и эффективность проводимого лечения [1,14].

В ходе лечения таких пациентов оправдано использование иммунокорригирующих средств, которые поддерживают кроветворение и противоинфекционную защиту и, принципиально важно, не усиливают воспаление, что ограничивает выбор средств, удовлетворяющих этим условиям. Так, в лечении пострадавших с политравмой была показана эффективность внутривенного введения иммуноглобулинов, направленного на ограничение системного воспаления и, одновременно, активацию фагоцитоза [22]. Д.Р. Ивченко с соавт. [7] приводят данные об эффективности использования синтетических препаратов (бестим, галавит), усиливающих противоинфекционные свойства моноцитов крови и не вызывающих активацию системного воспаления. Перспективными средствами для коррекции нарушений кроветворения при сочетанной являются препараты, созданные на основе нуклеиновых кислот и применяемые для восстановления кроветворения у пациентов с лучевой болезнью, после химитерапии, при тяжелом сепсисе [6;8].

Установлено, что для реализации биологической активности содержащих ДНК препаратов важным моментом является сохранение нативной (неденатурированной) формы дезоксирибонуклеата. Такие препараты повышают пролиферативную активность костного мозга и интенсивность работы клеток ретикуло-эндотелиальной системы, однако, они не исследовались при лечении пострадавших с политравмой [6;8].

Регуляторное действие ДНК осуществляется на клеточном уровне посредством концевых CрG фрагментов ДНК, как метилированных, так неметилированных [26]. Препарат дезоксирибонуклеата натрия Деринат® содержит не менее 50% неметилированных окончаний всех нуклеотидных цепочек, являющихся лигандами эндосомального толл-подобного рецептора 9 (TLR9) [15]. В эксперименте на мышах было выявлено, что местное применение дезоксирибонуклеата натрия уменьшало отек и повреждение кожи в области пролежней. Данный эффект достигался за счет подавления локального окислительного стресса, вызываемого ишемией-реперфузией на тканевом уровне [23].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния дезоксирибонуклеата натрия на противоинфекционную защиту и кроветворение у пострадавших с политравмой.

**Материал и методы**

Деринат® - коммерческий препарат дезоксирибонуклеата натрия - (ЗАО «Техномедсервис», Россия, регистрационный № Р N002916/01) представляет собой низкомолекулярные фрагменты нативной ДНК, полученные из молок осетровых рыб. При введении в организм повышенное накопление и потребление препарата происходит в наиболее активно делящихся клетках - в клетках костного мозга, иммунной системы, кожи и слизистых оболочек± [8].

Дизайн исследования - проспективное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом (протокол №4 от 18.05.2016 г.).

Критериями включения в исследование были: возраст пострадавших от 18 до 70 лет, наличие травматического шока II (средней) степени тяжести и III (тяжелой) степени c вероятной летальностью менее 50% (прогноз длительности шока ±Т от +7,5 часов до +48 часов) по Ю.Н.Цибину [16].

Критерии невключения: венерические заболевания, вирусный гепатит, ВИЧ, хроническая почечная недостаточность, эндокринная патология, хронические заболевания, требующие приема противовоспалительных препаратов, хроническая алкогольная или наркотическая зависимость, беременность.

Исследуемый препарат и плацебо имели разные по четности серии выпуска. Ни пациенты, ни медицинский персонал не знали, в какой из серий находится действующее вещество. Всем пострадавшим вводили по одному флакону (5,0 мл) препарата/плацебо внутримышечно ежедневно однократно в течение 10 дней, начиная со следующего дня после травмы. Рандомизация осуществлялась на основе генерации 60 случайных чисел. Пациенту с присвоенным случайным четным числом вводилась четная серия препарата, с нечетным - нечетная.

Из 60 последовательно включенных в исследование пострадавших с политравмой (май 2016 – май 2018) в итоговый анализ вошли 54 пациента. Из них 27 человек составили основную группу - I (с применением Дерината®) и 27 – группу сравнения -II (с плацебо). 6 пострадавших были исключены из исследования (перевод в другой стационар, выявление беременности).

Тяжесть полученных повреждений оценивали по шкале ISS [17]; комплексную оценку тяжести травмы и травматического шока, а также вероятный исход рассчитывали по прогностической формуле Ю.Н. Цибина (±Т) [16]. Развивающиеся осложнения учитывали с выделением угрожающих и не угрожающих жизни, а также инфекционных и неинфекционных.

Контрольные значения лабораторных показателей получены при обследовании 28 практически здоровых взрослых в возрасте 18-70 лет.

Всем пациентам проведено клиническое, инструментальное и лабораторное обследование в соответствии с клиническими рекомендациями. Дополнительно исследовали состояние иммунитета и кроветворения перед первым введением препарата и далее через 7 и 14 дней (соответственно через 1, 8 и 15 дней после травмы). Оценивали количество форменных элементов крови и содержание гемоглобина (Нb) (гематологический анализатор Sysmex XT4000, Япония). Определяли фенотипические и активационные маркеры клеток крови иммуноцитохимическим методом с использованием системы визуализации (Novolink Polymer Detection Systems, Великобритания) и моноклональных антител (Leica Biosystems, Великобритания): относительное и абсолютное количество клеток, экспрессирующих рецептор фактора стволовых клеток CD117+ (NCL cKIT) и адгезионный рецептор стволовых клеток CD34 (RTU-END), CD14+ моноцитов и CD14+ нейтрофильных гранулоцитов (НГ) (NCL-CD14), HLA-DR+ мононуклеаров (NCL-LN3), дефенсин+ нейтрофильных гранулоцитов, (human neutrophil peptides, HNP 1-3), (Def+НГ). Также определяли концентрацию в крови IL-6 (ИФА, Вектор Бест, Россия), С-реактивного белка (СРБ) и общего белка (ОБ) (Cobas 6000, с501, Швейцария). Содержание Hb и ОБ в крови пациентов оценивали в течение всего срока госпитализации. У каждого больного подсчитывали количество дней с зафиксированной анемией (Hb<90 г/л) и гипопротеинемией (ОБ<60 г/л).

Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ Statistica 10. Описательная статистика таблиц представлена показателями средней величины и ее средней ошибки (M±m), а также расчетом процентных долей. Оценка различий количественных показателей произведена с помощью непараметрических критериев: при межгрупповом сравнении - по критерию Манна-Уитни, при внутригрупповом - по тесту Уилкоксона. Достоверной считалась статистическая значимость различий Р<0,05.

**Результаты**

Пострадавшие обеих групп не различались по возрасту, полу, тяжести повреждений (ISS) и шока (±Т), характеру полученных повреждений, объему гемотрансфузионной терапии (табл.1).

Не было выявлено различий между группами по частоте встречаемости и доминирующей роли повреждений различных частей тела, а также по содержанию проведенного оперативного и консервативного лечения.

На следующие день после травмы пациенты группы I не отличались от группы II по уровню в крови гемоглобина (Нb, г/л -107±3 и 104±4, р=0,551) и общего белка (ОБ, г/л – 56±1 и 54±2, р=0,189) соответственно.

Анализ состояния пациентов в ходе стационарного этапа показал, что у 17% всех пациентов с политравмой (5 в группе I и 4 в группе II) отсутствовали какие-либо осложнения. У 33% (9 в группе I и 9 в группе II) отмечали развитие только анемии и/или гипопротеинемии. У 50% пациентов (13 в группе I и 14 в группе II) были выявлены как лабораторные признаки анемии и/или гипопротеинемии, так и клинические осложнения.

Результаты мониторинга состояния кроветворения и иммунитета у пациентов представлены в табл.2. При сравнительном исследовании количества форменных элементов крови в группе I (получавших Деринат) на 7-е сутки наблюдения выявили достоверно более высокие уровни лимфоцитов и моноцитов по сравнению с группой II. Количество гранулоцитов в обеих группах не различалось в течение всего периода наблюдения.

С целью оценки влияния препарата на ранний этап кроветворения и связанного с ним репаративного процесса исследовали содержание в крови CD117+ и CD34+ клеток (табл.3). У пациентов обеих групп исходное содержание этих клеток перед первым введением препарата превышало значение нормы в 3-3,5 раза. Через 7 суток в группе I наблюдали достоверное увеличение количества CD117+клеток в 1,8 раза, в отличие от группы II, где количество этих клеток не изменялось на протяжении всего срока наблюдения. Количество CD34+ мононуклеаров через 7 суток достоверно возрастало как у пациентов группы I (в 1,46 раза), так и группы II (в 1,41 раза). При этом в группе I абсолютное количество этих клеток оказалось достоверно большим.

О состоянии ранней противоинфекционной защиты можно судить по уровню содержания в крови CD14+моноцитов, CD14+НГ, HLA-DR+ мононуклеаров, а также по степени мобилизации из костного мозга в кровь Def+НГ. Антигены CD14 экспрессируются в составе толл-подобных рецепторов 4 типа (Toll-like receptor 4, TLR4) на мембране моноцитов, макрофагов и НГ для раннего распознавания консервативных патоген ассоциированных мембранных паттернов (ПАМП). Высокоспецифичное распознавание бактериальных антигенов и презентация их Т-лимфоцитам связаны с экспрессией антигенов МНС II класса – HLA-DR - макрофагами, моноцитами, В-лимфоцитами, дендритными клетками. Бактерицидная активность НГ в значительной степени определяется присутствием в лизосомах α-дефенсинов 1-3 типа (антимикробных пептидов), с помощью которых осуществляется киллинг бактерий и вирусов [9]. Дефенсины выявляются в миелоидных клетках, начиная со стадии промиелоцита [4].

Перед первым введением препарата в обеих группах содержание CD14+моноцитов в крови пострадавших в 9-10 раз превышало значение нормы (табл.3). Через 7 дней количество этих клеток возрастало в в обеих группах в 1,5 раза. На 14 сутки наблюдали достоверно более высокое содержание CD14+моноцитов в группе I по сравнению с группой II. Содержание CD14+НГ плавно снижалось у пациентов обеих групп на протяжении 14 дней, но в большей степени у пациентов группы I. Количество антигенпрезентирующих HLA-DR+ мононуклеаров исходно не отличалось от уровня нормы в обеих группах. Через 7 дней количество этих клеток достоверно возрастало в обеих группах в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем. В группе I достигнутое повышение сохранялось и на 14-й день наблюдения в отличие от группы II, что свидетельствовало об активирующем влиянии препарата на антигенпрезентирующую функцию мононуклеаров.

Содержание в крови Def+НГ до введения препарата в обеих группах было в пределах референсных значений. В группе I наблюдали небольшой рост относительного содержания Def+НГ на протяжении 14 дней (табл.3), в то время как у пациентов группы II доля этих клеток плавно снижалась в популяции гранулоцитов, достигая достоверного различия между группами к 14-му дню.

Итак, усиление миграции в кровь предшественников кроветворения (CD117+ и CD34+) под влиянием Дерината происходило к 7-му дню наблюдения. К 14-му дню возрастало количества клеток, отражающих состояние противоинфекционной защиты - CD14+моноцитов, HLA-DR+ мононуклеаров, Def+НГ.

Введение препарата не сопровождалось усилением системного воспаления у обследованных пациентов (табл.4). Высокие концентрации IL-6 и СРБ, исходно отмеченные у пациентов обеих групп, одинаково плавно снижались на протяжении 14 дней.

Для более детального изучения эффективности применения Дерината® в группах I и II были выделены подгруппы – а) с клинически значимыми осложнениями (инфекционными, неинфекционными, угрожающими жизни, не угрожающими жизни - 13 чел.) и б) без осложнений (14 чел.).

При сравнительном анализе содержания в крови предшественников кроветворения и клеток противоинфекционной защиты (табл.5) выявили более выраженный иммунокорригирующий эффект Дерината® у пациентов с осложнениями (подгруппы Ia и IIa). В подгруппе Ia наблюдали 1,7-кратное увеличение содержания СD117+ мононуклеаров к 7-м суткам после начала введения препарата в отличие от 2-хкратного снижения содержания этих клеток у пациентов подгруппы IIa (p=0,001). Содержание СD34+ мононуклеаров возрастало в подгруппе Ia в 1.4 раза к 14 дню и достоверно отличалось от аналогичного показателя в подгруппе IIa (p=0,038). В подгруппах Iб и IIб не выявили достоверных различий в содержании СD117+ и СD34+ мононуклеаров в течение 14 дней.

Характерной особенностью пациентов с политравмой оказалось уменьшение доли НГ, содержащих антимикробные пептиды - дефенсины (Def+НГ). У пациентов подгрупп, получавших Деринат® (Ia и Iб) отметили тенденцию постоянного роста содержания этих клеток в течение 14 дней, причем более выраженное увеличение наблюдали в подгруппе Iа (с осложнениями). В подгруппах, получавших плацебо (Iб и IIб), процентное содержание Def+НГ постепенно снижалось на протяжении 14 дней (табл.5).

Общеклиническая оценка применения Дерината в комплексной терапии пациентов с политравмой была следующей. Продолжительность стационарного лечения у пациентов группы I, получавших Деринат, оказалась меньше на 7 дней и составила 32,8 дня, в то время как в группе II c плацебо она была 39,6 дня. Наибольший эффект препарата выявили в группах с осложнениями политравмы (табл.6). У пациентов подгруппы Ia по сравнению с пациентами подгруппы IIa использование Дерината® способствовало достоверному уменьшению количества осложнений в 1,8 раза, причем преимущественно за счет инфекционных не угрожающих жизни. Также отметили достоверное уменьшение продолжительности анемии и гипопротеинемии у пациентов подгруппы Ia по сравнению с пациентами подгруппы IIa на 4,7 дня и 11,3 дня соответственно.

При введении препарата мы не наблюдали усиления местных и системных проявлений воспаления, а также каких-либо иных нежелательных эффектов.

**Обсуждение**

Обширные повреждения, в том числе и механические, являются причиной интенсивной миграции клеток из костного мозга, в том числе и стволовых, необходимых для восстановления тканей, усиления противоинфекционной защиты и формирования репаративных процессов. Уровень активации костномозгового кроветворения, репаративной активности и репопуляции гемопоэтических стволовых клеток можно оценивать по количеству циркулирующих в крови мононуклеаров, экспрессирующих рецептор фактора роста стволовых и тучных клеток CD117 (SCFR, тирозинкиназа Kit) и адгезионный рецептор стволовых клеток CD34 [19]. Количество циркулирующих в крови моноцитов и зрелых гранулоцитов и их способность к активации отражают компетентность костномозгового кроветворения при политравме.

Положительный результат применения нативных фрагментов ДНК у пострадавших с политравмой состоял в увеличении в крови количества мононуклеаров, экспрессирующих рецептор фактора роста [стволовых](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%82%D0%B2%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D0%B5_%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B8) и [тучных](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%83%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B8) клеток CD117 и адгезионный рецептор стволовых клеток CD34 (табл.3), что свидетельствовало об усилении миграции стволовых клеток в кровоток. Максимум этого эффекта отмечался через 7 дней после начала введения препарата.

Известно, что у здоровых взрослых около половины НГ содержат в лизосомах антимикробные пептиды α-дефенсины 1-3 типа (Def+НГ), которые осуществляют лизис микроорганизмов внутри- и внеклеточно. При политравме скорость противоинфекционного «реагирования» фагоцитов приобретает особое значение в силу легкости проникновения инфекции через поврежденные покровные ткани и транслокации эндогенной микрофлоры со слизистых оболочек в кровь в условиях нарушенной гемодинамики и тканевой гипоксии [11]. У пациентов, получавших Деринат®, наблюдали достоверное увеличение относительного содержания в крови Def+НГ, в то время как у пациентов, получавших плацебо, этот показатель прогрессивно снижался (табл. 3).

Острая анемия и гипопротеинемия являются закономерным следствием тяжелой травмы и массивной кровопотери. Применение Дерината® способствовало уменьшению длительности посттравматической анемии и гипопротеинемии (табл.6). Это крайне важно для устранения неблагоприятного действия тканевой и гемической гипоксии, улучшения белкового обмена, а также восстановления антимикробного потенциала крови и активизации репаративного процесса в тканях.

Результаты исследования продемонстрировали, что в условиях дополнительной активации костномозгового кроветворения у пострадавших с политравмой могут быть улучшены результаты лечения. У пациентов, пролеченных с применением Дерината®, количество выявленных осложнений оказалось в 1,8 раза меньше, чем у пациентов группы с плацебо.

Иммунокорригирующее действие Дерината® связано с наличием в нативных фрагментах ДНК метилированных и неметилированных CpG (цитозин-фосфат-гуанин) дезоксинуклеотидов. Оба вида CpG дезоксинуклеотидов способны оказывать активирующее влияние на реакции врожденного иммунитета. После проникновения внутрь клетки неметилированные CpG мотивы активируют экспрессию TLR-9 на мембранах эндосом моноцитов, макрофагов, В-лимфоцитов и дендритных клеток [15,24]. Конститутивно этот рецептор экспрессируют только B-лимфоциты и плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC) [12, 25]. Метилированные CpG дезоксинуклеотиды также способны вызывать активацию клеток иммунной системы, но при этом задействованы другие сигнальные пути [20]. В силу сходства неметилированных CpG мотивов фрагментированной ДНК с ПАМП микроорганизмов они распознаются как антигены. В результате происходит активация внутриклеточных сигнальных путей, повышение антигенпрезентирующей способности клеток, усиление продукции микробицидных факторов и цитокинов. Активированные иммунокомпетентные клетки вызывают вторичную активацию клеточного и гуморального иммунитета, фагоцитоза, повышают продукцию гемопоэтинов. То есть, все клетки иммунной системы могут активироваться после взаимодействия с CpG-ДНК: непосредственно или посредством костимуляции [18].

В экспериментальных условиях выявлена способность дезоксирибонуклеата натрия повышать уровень некоторых провоспалительных агентов. По данным Т.В. Русиновой [13] препарат усиливал продукцию ИЛ-8 и интерферона-альфа клетками крови здоровых людей и пациентов с острыми воспалительными заболеваниями носоглотки in vitro. В противоположность этому, J.Liu с соавт. [23] наблюдали противовоспалительное действие Дерината® при применении его в виде аппликаций на область экспериментального пролежня, состоявшее в ингибировании альфа рецептора IL-6 в зоне пролежня.

В ходе настоящего исследования было установлено, что у пострадавших с политравмой активация кроветворения и противоинфекционной защиты, достигнутая в результате введения Дерината®, не сопровождалась усилением системного воспаления (табл.4).

**Заключение**

Введение нативных фрагментов дезоксирибонуклеата натрия пострадавшим с политравмой ежедневно с 1-го по 10-й дни после травмы активировало миграцию предшественников кроветворения из костного мозга в кровоток и усиливало противоинфекционную защиту организма посредством увеличения количества нейтрофильных гранулоцитов, содержащих антимикробные пептиды – α-дефенсины 1-3 типа, моноцитов, экспрессирующих антигены распознавания ЛПС (CD14+) и антигенпрезентирующие мембранные комплексы (CD HLADR+).

Корригирующее влияние дезоксирибонуклеата натрия в наибольшей степени проявилось у пациентов с осложнениями политравмы. Применение препарата способствовало уменьшению продолжительности и степени выраженности посттравматической гипопротеинемии и анемии. Положительный клинический эффект дополнительного применения препарата в комплексном лечении пациентов состоял в сокращении срока госпитализации и уменьшении количества осложнений. При этом не наблюдалось усиления местных и системных проявлений воспаления.