

УДК 616.34-002.4+616-099+616.155.3-053.2

© Э. Н. Нгема, 2009.

ДИНАМИКА ПЛАЗМИН-ИНДУЦИРОВАННОГО СИНТЕЗА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСИКОЗА ПРИ ТЯЖЕЛОМ ТЕЧЕНИИ КИШЕЧНОГО ТОКСИКОЗА У ДЕТЕЙ

Э. Н. Нгема

*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, кафедра госпитальной педиатрии с курсом детских инфекционных болезней (зав. кафедрой – проф. Лагунова Н. В.)
г. Симферополь, А.Р. Крым, Украина.*

DYNAMICS OF PLASMIN INFLUENCE OF SYNTHESIS FACTOR OF NECROSIS OF TNF- α BY MONONUCLEAR LEUKOCYTES UNDER ACT OF PHOSPHATIDILCHOLIN LIPOSOMES AT DEVELOPMENT OF EKSICOSIS AT HEAVY MOTION OF INTESTINAL TOKSICOSIS OF CHILDRENS

E. N. Ngema

SUMMARY

Children with acute intestinal diseases (AID) with moderate-severe and severe clinical current level of TNF- α in cultural medium of cells culture of mononuclear leukocytes was studied. It was determined, that under plasmin influence has a place imbalance deepening of cytokine homeostasis – increase of synthesis by mononuclear leukocytes by proinflammatory cytokine TNF α , and also modulating influence on this process of phosphatidilcholin liposomes.

ДИНАМІКА ПЛАЗМІН-ИНДУКОВАНОГО СИНТЕЗУ ЧИННИКА НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ-АЛЬФА МОНОНУКЛЕАРНИМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПІД ВПЛИВОМ ФОСФАТИДІЛХОЛІНОВИХ ЛІПОСОМ ПРИ РОЗВИТКУ ЕКСІКОЗУ ПРИ ВАЖКОМУ ПЕРЕБІГУ КИШКОВОГО ТОКСИКОЗУ У ДІТЕЙ

E. N. Ngema

РЕЗЮМЕ

У дітей, що страждають на гострі кишкові захворювання (ГКЗ) з середньо-важкою та важким клінічним перебігом вивчено рівень TNF- α в культуральному середовищі культури клітин мононуклеарних лейкоцитів. Встановлено, що під впливом плазміну у хворих на ГКЗ має місце поглиблення дисбалансу цитокінового гомеостазу - зростання синтезу мононуклеарними лейкоцитами прозапального цитокіну TNF- α , а також модулюючий вплив на цей процес фосфатіділхолінових ліпосом.

Ключевые слова: фосфатидилхолиновые липосомы, плазмин, фактор некроза опухоли- α , кишечный токсикоз у детей.

В рамках современной научной концепции синдрома инфекционного токсикоза важная патогенетическая роль в развитии острой неспецифической воспалительной реакции на инфекционный агент отводится системе цитокинов, контролирующей процессы реализации иммунной и воспалительной реактивности [5]. Так, синдром системного воспалительного ответа (SIRS), ассоциированный с накоплением провоспалительных цитокинов в крови и реализацией их дистантных эффектов (на удалении от первичного очага повреждения) рассматривается в качестве важной причины нарушения водно-электролитного, энергетического баланса и кислотно-основного

состояния, а также развивающихся неврологических расстройств при острых кишечных заболеваниях (ОКЗ) у детей [5, 6]. Установлено, что при развитии (SIRS) возрастание уровня провоспалительных цитокинов в 5-10 раз и более приводит к развитию дисфункции сосудистого эндотелия, что, в свою очередь, сопровождается формированием синдрома полиорганной недостаточности с возможным развитием синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания [7, 8, 9].

Указанные факты явились основанием для обсуждения целесообразности включения “антицитокиновой стратегии” в комплексную терапию токсикозов. При этом одной из точек

приложения лекарственных средств с антицитокиновой активностью являются лейкоциты (Т-клетки, активированные моноциты/макрофаги и другие виды лейкоцитов), а также эндотелиоциты посткапиллярных венул, тромбоциты и различные типы стромальных клеток – основные продуценты цитокинов [10, 11, 12].

В рамках “цитокиновой” патогенетической концепции токсикозов большое значение придается модуляторам синтеза провоспалительных цитокинов [13, 14]. Так, в частности, к активаторам синтеза широкого спектра цитокинов мононуклеарными лейкоцитами и клетками сосудистого эндотелия относится прежде всего активная форма фибринолитического фермента – плазмина, а также активаторы пламиногена [15, 16].

Таким образом, дальнейшее изучение цитокин-опосредованных патогенетических механизмов развития инфекционных токсикозов представляется нам весьма перспективным направлением, ибо оно является базисом для разработки новых путей дифференцированной патогенетической терапии указанного синдрома.

Общей целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности применения фосфатидилхолиновых липосом (липина) для коррекции дисбаланса цитокинового гомеостаза в комплексном лечении инфекционных токсикозов различного генеза у детей. В рамках указанной цели в статье представлены результаты исследования у подобных больных особенностей функциональной активности (синтез провоспалительных цитокинов) лейкоцитов в витральных культуральных экспериментальных моделях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 35 больных острыми кишечными заболеваниями (ОКЗ), находившихся на лечении в детской инфекционной больнице г. Симферополя.

У всех обследованных лиц при поступлении в стационар зарегистрировано развитие токсикоза: средней степени тяжести (20 больных – 1-я группа), тяжелого течения (9 больных – 2-я группа), тяжелого течения с эксикозом (6 больных – 3-я группа).

Таблица

Уровень TNF- α в культуральной среде культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов у больных 1-й, 2-й и 3-й групп, пг/мл культуральной среды

Группа	Стат. показ.	1-я группа	2-я группа α	3-я группа
Эксперимент 1 (уровень TNF- α в культуральной среде)	M \pm m n p p ₁ p ₂	11,07 \pm 0,70 11 – – –	22,04 \pm 1,21 9 – < 0,001 –	39,73 \pm 2,08 6 – < 0,001 < 0,001
Эксперимент 2 (преинкубация клеток с плазмином перед началом культивации)	M \pm m n p p ₁ p ₂	25,08 \pm 1,04 11 < 0,001 – –	39,29 \pm 1,67 9 < 0,001 < 0,001 –	67,23 \pm 2,55 6 < 0,001 < 0,001 < 0,001
Эксперимент 3 (преинкубация клеток с плазмином + липин в культуральную среду перед началом культивации)	M \pm m n p p ₁ p ₂	16,34 \pm 0,98 11 < 0,001 – –	28,71 \pm 1,40 9 < 0,01 < 0,001 –	47,51 \pm 2,47 6 < 0,05 < 0,001 < 0,001

Примечание: p – достоверность различий, высчитанная в сравнении с экспериментом 1 в той же группе больных, p₁ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с 1-й группой больных в соответствующем эксперименте, p₂ – достоверность различий, высчитанная в сравнении со 2-й группой больных в соответствующем эксперименте.

Концентрацию TNF- α в культуральной среде культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов определяли иммуноферментным методом с

использованием коммерческих наборов “ИФА-TNF-ALPHA” (ООО “Цитокин”). При исследовании культуральных жидкостей для разведения стандартов

вместо буфера С использована культуральная среда. Оценка результатов осуществлялась фотометрически. Культивация клеток мононуклеарных лейкоцитов проводилась в экспериментальной модели краткосрочной культуры клеток по Лурия Е.А. (1972). Проводились также эксперименты с определением уровня TNF- α в культуральной среде без и с инкубацией культивируемых клеток с плазмином. Рабочий раствор плазмина готовили путем активации плазминогена (40 мг растворяли в 10 мл 0,85 % NaCl) стрептокиназой в объемных соотношениях 10 мл и 0,2 мл соответственно в течение 10 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования уровня TNF- α в культуральной среде культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов у больных 1-й, 2-й и 3-й групп представлены в табл.

Известно, что TNF- α относят к провоспалительным цитокинам, играющим существенную патогенетическую роль в развитии и прогрессировании воспалительного процесса [17, 18]. Помимо этого, TNF- α активно влияет на дифференцировку макрофагов и стимулирует фагоцитоз [19].

Как видно из табл., у больных 1-й группы под влиянием преинкубации клеток с плазмином имеет место повышение уровня провоспалительного цитокина TNF- α в культуральной среде на 126,6 % ($p < 0,001$), у больных 2-й и 3-й групп – соответственно на 78,3 % ($p < 0,001$) и на 69,2 % ($p < 0,001$). При построении “биологического уравнения” эксперимента нами учитывалось, что такие факторы фибринолиза (образующиеся *in loco morbi*), как активная форма фибринолитического фермента – плазмина (а также активаторы плазминогена) относятся к активаторам (включая NF- κ B-зависимым) синтеза широкого спектра цитокинов мононуклеарными лейкоцитами, клетками сосудистого эндотелия, а также активаторами системы MMPs [16].

Таким образом, можно предположить, что под влиянием ассоциированной с воспалением плазминемии у больных ОКЗ со средне-тяжелым и тяжелым течением имеет место нарастание лейкоцито(лимфоцито)-опосредованного дисбаланса цитокинового гомеостаза – возрастанием синтеза провоспалительного цитокина TNF- α мононуклеарными лейкоцитами.

Научной аргументацией включения в экспериментальную культуральную модель липина явились научные факты, позволяющие утверждать, что использование липосомальной формы фосфатидилхолина (повышенная концентрация которого наблюдается в клетках таких жизненно важных органов, как легкие, сердечная мышца, головной и спинной мозг, печень, кишечник и др.)

позволяет получить дополнительные биологические эффекты: модулирование дисбаланса иммунного ответа путем образования специфических иммуноглобулинов; восстановление и стабилизация состава и структуры биологических мембран клеток при нарушениях метаболических процессов; выведение патогенных веществ и токсических продуктов из органов и тканей при помощи липидных молекул с целью нормализации обменных процессов; дополнительное обеспечение энергией метаболических реакций в процессе жизнедеятельности клеток [1, 2, 3, 4].

Нами установлено, что под влиянием введения в культуральную среду фосфатидилхолиновых липосом (липина) уровень провоспалительного цитокина TNF- α в культуральной среде существенно снижается – у больных 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно на 34,8 %, 26,9 % и 29,3 %. Таким образом, нами установлено, что иммуноактивное действие фосфатидилхолиновых липосом (экстраиммунный иммуномодулятор) включает влияние на плазмин-индуцированный синтез провоспалительного цитокина TNF- α мононуклеарными лейкоцитами.

ВЫВОДЫ

1. Наличие токсикоза у больных ОКЗ со среднетяжелым и тяжелым течением характеризуется статистически значимым углублением дисбаланса цитокинового гомеостаза – возрастанием синтеза мононуклеарными лейкоцитами провоспалительного цитокина TNF- α , что формирует условия для нарастания системного воспалительного процесса.

2. Установлено, что иммуноактивное действие фосфатидилхолиновых липосом (экстраиммунный иммуномодулятор) включает влияние на плазмин-индуцированный синтез TNF- α мононуклеарными лейкоцитами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.В.Серова, В.С.Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
2. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы. - М.: Издательский дом “Русский врач”, 2001. – 396 с.
3. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. - М.: Издательский дом “Русский врач”, 1998. – 296 с.
4. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н. Системное воспаление как типовой патологический феномен – миф или реальность? // Вестник РАН. – 2004, №3. – С. 18-23.
5. Bone R.C. Toward an epidemiology and natural history of SIRS// JAMA. – 1999. – Vol.268. – P. 3452-3455.
6. Bone R.C. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation// Critical Care Medicine. – 1996. – Vol.24. – P. 163-72.

7. Bula D., Ghaly E. Liposome delivery systems // *Drug. Dev. Ind. Pharm.* – 1999. – Vol.21, №14. – P.1621-1629.
8. Crowe I.H., Crowe L.M. In: G. Gregoriadis ed *Liposome Technology*, vol I, CRC Press Boca Raton, Florida, 1998. – P.229-252.
9. Crowe I.H., Crowe L.M., Chapman D. Liposomes: preparation, characterization and preservation // *Science*. - 1998. – Vol. 223, №5. – P.701-703.
10. Hesse D.G., Tracey K.J., Fong Y. et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1998. – Vol. 166. – P. 147–153.
11. Hurley J.V. *Acute inflammation*. – Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1998. – 374 p.
12. Jutel M. Adhesion molecules in allergic inflammation / *Allergology & Clinical Immunology International*. – 1999. – Vol.5. – №3. – P.153–158.
13. Kaplan A.P., Kuna P. Chemokines and the activation of basophils and eosinophils / *Allergology & Clinical Immunology International*. – 1998. – Vol.5. – №10. – P.154–157.
14. Lipid membrane structures / S.Hirota, H.Kikuchi, H.Yamauchi, M.Tomicawa // *United States Patent*. - 1990. – P.496-598.
15. Luster A.D. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation // *N. Engl. J. Med.* - 1998. - Vol.338. - P.436–445.
16. Mainous M., Ertel W., Chaudary I. The gut: a cytokine – generating organ in systemic inflammation // *Shock*. – 1995. – Vol.4. – P. 193-209.
17. Moller G., Yammarmstrom L., Moller E., Persson U., Smith E. Lymphocyte activation by Concanavalin A // *Proceedings of the Fourth European Immunology Meeting*. – Budapest, 1978. – P. 178–189.
18. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients / Rodrigez M., Santolaria F., Jarque A. et al. // *Cytokine*. – 2001. – Vol.15. – P. 232-236.
19. Rothwell N.J. Cytokines and thermogenesis // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* - 1999. - Vol.117. - P.98–115.
20. Sanbery A.L. Cellular functions in immunity and inflammation. // *Ann. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol.11. – P. 272–392.