

УДК 616.24-002.5+616.24-002+616.155.194+616-073.75:577.175.14

© В.А. Лимарев, М.Н. Гришин, 2011.

ВЛИЯНИЕ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ (ЛИПИНА) НА ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННУЮ ЛИМФОИДНУЮ (ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ) РЕГУЛЯЦИЮ СИНТЕЗА ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ У БОЛЬНЫХ С СОЧЕТАННЫМ ТЕЧЕНИЕМ ХОЗЛ И АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ ТУБЕРКУЛЕЗ ЛЕГКИХ

В. А. Лимарев, М. Н. Гришин

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского», г.Симферополь.

INFLUENCE OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOM (LIPINE) ON LYPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED LIMPHOID (LEUKOCYTTIC) REGULATION OF CYTOKINES SYNTHESIS BY CELLS OF BRONCI EPITHELIUM IN PATIENTS WITH ASSOCIATIVE FLOW OF PCOD AND ANEMIC SYNDROME IN PATIENTS WHO HAD PULMONARY TUBERCULOSIS

V. A. Limarev, M. N. Grishin

SUMMARY

У перенесших туберкулез легких больных хроническим обструктивным заболеванием легких (ХОЗЛ) с анемическим синдромом изучено влияния липина на LPS-индуцированную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза провоспалительных цитокинов клетками эпителия бронхов. Установлено, что особенностью патогенеза ХОЗЛ у больных с анемическим синдромом является особая форма регенераторно-пластической недостаточности, характеризующаяся достоверно более высоким синтезом клетками бронхиального эпителия провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β .

ВПЛИВ ФОСФАТИДИЛХОЛІНОВИХ ЛІПОСОМ (ЛІПІНУ) НА ЛІПОПОЛІСАХАРИД-ІНДУКОВАНУ ЛІМФОЇДНУ (ЛЕЙКОЦИТАРНУ) РЕГУЛЯЦІЮ СИНТЕЗУ ЦИТОКІНІВ КЛІТИНАМИ ЕПІТЕЛІЮ БРОНХІВ У ХВОРИХ ІЗ ПОЄДНАНИМ ПЕРЕБІГОМ ХОЗЛ ТА АНЕМІЧНОГО СИНДРОМУ В ОСІБ, КОТРІ ПЕРЕНЕСЛИ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНІВ

В. А. Лімарев, М. М. Грішін

РЕЗЮМЕ

У хворих, котрі перенесли туберкульоз легень з хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ) з анемічним синдромом, вивчено вплив ліпіну на LPS-індуковану лімфоїдну (лейкоцитарну) регуляцію синтезу прозапальних цитокінів клітинами епітелію бронхів. Установлено, що особливістю патогенезу ХОЗЛ у хворих з анемічним синдромом є особлива форма регенераторно-пластичної недостатності, що характеризується достовірно більш високим синтезом клітинами бронхіального епітелію прозапальних цитокінів TNF- α і IL-1 β .

Ключевые слова: фосфатидилхолиновые липосомы, липин, хроническое обструктивное заболевание легких, анемия, туберкулез легких.

В рамках современной патогенетической концепции цитокин-ассоциированных патогенетических механизмов как прогрессирования ХОЗЛ, так и формирования системных эффектов хронических воспалительных заболеваний, включая анемию [9], особый интерес, по нашему мнению, представляет оценка цитокинового гомеостаза при сочетанном течении ХОЗЛ и анемии у лиц, перенесших ТБС легких.

Цитокины – чувствительные к уровню окислительно-восстановительного потенциала и LPS-стимулу медиаторы [6]. Так, установлено, что в условиях гипоксии клетки способны не только повышать продукцию цитокинов - факторов роста, но и изменять экспрессию рецепторов в сторону их увеличения [7].

Еще одним важным аспектом научной концепции прогрессирования ХОЗЛ за счет формирования как фиброза, так и эмфиземы легких является доказанная бактериальная LPS-зависимая и эластаза-зависимая активация синтеза широкого спектра цитокинов в тканях легких [8].

При этом действие эндотоксина (LPS) грамотрицательной флоры кишечника, в норме поступающего в портальный кровоток при самообновлении пула кишечной палочки, может быть как физиологическим, так и патологическим [2]. Нарушение же механизмов нейтрализации LPS закономерно приводит к системной эндотоксемии кишечного происхождения. Этому способствуют прежде всего гипоксия

и гипоксемия любого генеза и другие причины [5].

У лиц с верифицированной этиологией острой респираторной вирусной инфекцией с наличием бронхиальной обструкции доказано наличие свободного LPS в плазме, идентифицирован LPS, связанный с нейтрофилами, а также выявлен 8-10-кратный рост концентрации клеточно-связанной эндотоксемии [5].

У больных ХОЗЛ в периоде обострения зарегистрирована системная эндотоксемия, высокий уровень LPS в мокроте. При этом установлено, что LPS кишечной палочки способен потенцировать угнетение миграции лейкоцитов при их взаимодействии с легочным антигеном, повышать функциональную активность хелперных лимфоцитов, снижать их супрессорную активность [1].

Общей целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности применения фосфатидилхолиновых липосом (липина) для коррекции анемического и гипоксического синдромов, а также дисбаланса цитокинового гомеостаза в комплексном лечении ХОЗЛ у лиц с анемией и перенесших туберкулез легких.

В рамках указанной цели в статье представлены результаты исследования влияния липина на LPS-индуцированную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза цитокинов клетками эпителия бронхов у больных с сочетанным течением ХОЗЛ и анемического синдрома у лиц, перенесших туберкулез легких.

Таблица 1

Влияние фосфатидилхолиновых липосом на LPS-индуцированную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза TNF- α клетками эпителия бронхов у больных 1-й, 2-й и 3-й групп, пг/мл

Группа	Стат. показ.	1-я группа Больные ХОЗЛ без анемии, I-II степени тяжести, санаторно-курортный этап лечения	2-я группа Больные ХОЗЛ с нормохромной и нормоцитарной анемией, I-II степени тяжести, санаторно-курортный этап лечения	3-я группа Больные ХОЗЛ с нормохромной и нормоцитарной анемией, III степень тяжести, фтизиопульмонологический стационар
Опыт 1 (уровень TGF- β 1 в культуральной среде)	M \pm m n p	20,23 \pm 0,98 20 –	26,47 \pm 1,16 20 < 0,001	33,78 \pm 1,24 12 < 0,001
Опыт 2 (в культуральную среду вводится взвесь аутологических мононуклеаров)	M \pm m n p p ₁	22,92 \pm 1,22 20 – < 0,1	29,06 \pm 1,17 20 < 0,001 < 0,2	38,72 \pm 1,89 12 < 0,001 < 0,05
Опыт 3 (преинкубация мононуклеаров с LPS отмывание клеток в культуральную среду)	M \pm m n p p ₁ p ₂	24,36 \pm 0,83 20 – < 0,01 < 0,5	36,31 \pm 1,11 20 < 0,001 < 0,001 < 0,001	44,50 \pm 1,81 12 < 0,001 < 0,001 < 0,05
Опыт 4 (преинкубация мононуклеаров с LPS отмывание клеток инкубация клеток с липином в культуральную среду)	M \pm m n p p ₁ p ₂ p ₃	18,96 \pm 0,76 20 – < 0,5 < 0,01 < 0,001	27,88 \pm 1,34 20 < 0,01 < 0,5 > 0,5 < 0,001	31,33 \pm 1,22 12 < 0,2 < 0,2 < 0,01 < 0,001

Примечание: p – достоверность различий, высчитанная в сравнении с 1-й группой больных в соответствующем опыте, p₁ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с опытом 1 в той же группе больных, p₂ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с опытом 2 в той же группе больных, p₃ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с опытом 3 в той же группе больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 106 больных мужского пола, которых распределили следующим образом:

1-я группа – 20 больных ХОЗЛ (I-II степени тяжести, санаторно-курортный этап лечения), перенесших ТВС легких и с уровнем гемоглобина 135 г/л,

2-я группа – 20 больных ХОЗЛ (I-II степени тяжести, санаторно-курортный этап лечения), перенесшие ТВС легких и с уровнем гемоглобина < 135 г/л (анемия нормохромная и нормоцитарная),

3-я группа – 12 больных ХОЗЛ (III степени тяжести, фтизиопульмонологический стационар), перенесшие ТВС легких и с уровнем гемоглобина < 135 г/л (анемия нормохромная и нормоцитарная).

Все больные 1-й, 2-й и 3-й групп были мужского пола.

Материалом исследования служили мокрота и бронхоальвеолярные смывы, полученные при диагностической бронхоскопии (у части больных 3-й группы в условиях стационара).

Определение уровня TNF- α и IL-1 β в культуральной среде культуры клеток эпителия бронхов определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов (ООО “Цитокины” IL-1 β , протеиновый контур – TNF- α). Оценка результатов осуществляется фотометрически.

Нами использован метод краткосрочных органических культур, обеспечивающий культивирование эпителия *in vitro* по Лурия Е.А. [4]. По завершении культивирования эпителиальных клеток бронхов проводилось исследование уровня цитокинов в супернатанте культуры клеток (опыт 1).

Параллельно ставилась еще одна серия экспериментов, в ходе которых суспензия аутологичных мононуклеарных клеток, в дозе $80 \cdot 10^6$ (контроль – в камере Горяева) вводилась в культуральную среду при начале культивирования (опыт 2). В опыте 3 проводилась преинкубация мононуклеаров с 10,0 мкг/мл липополисахарида (эндотоксина) в течение 30 минут при 37°C с последующим отмыванием клеток и их введением в культуральную среду при начале культивирования.

В опыте 4 проводилась преинкубация мононуклеаров с 10,0 мкг/мл липополисахарида (ЭТ) в течение 30 минут при 37°C с последующим отмыванием клеток и инкубацией клеток с липином с последующим введением в культуральную среду при начале культивирования.

Липополисахарид (эндотоксин) получали из штаммов *E. coli* K 30 и C 600(lux)(R-мутанты) по методу Westphal O. (1984) [10]. Мягкий гидролиз нативного ЭТ проводили уксусной кислотой [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования влияния фосфатидилхолиновых липосом на LPS-индуцированную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза провоспалительного цитокина TNF- α клетками эпителия

бронхов у больных 1-й, 2-й и 3-й групп представлены в табл. 1 и 2.

Нами установлено (табл. 1), что у больных 1-й и 2-й групп под влиянием введения в культуру клеток аутологичных мононуклеаров синтез TNF- α клетками эпителия бронхов существенно не меняется, а у больных 3-й группы – возрастает на 14,6% ($p_1 < 0,05$).

У больных 1-й группы уровень TNF- α в опыте 3 (в сравнении с опытом 2) существенно не меняется. У больных 2-й и 3-й групп под влиянием LPS-стимула (в сравнении с опытом 2) выявлен статистически значимый рост исследованного показателя соответственно на 24,9% ($p_2 < 0,001$) и 14,9% ($p_2 < 0,05$).

Выявленная нами у больных 2-й и 3-й групп LPS-индуцированная лимфоцито(лейкоцито)-опосредованная стимуляция синтеза провоспалительных цитокинов клетками эпителия бронхов, по нашему мнению, может выступать в качестве фактора самоподдержания хронического воспалительного процесса.

Обращает на себя внимание, что в опыте 4 нами выявлено модулирующее синтез TNF- α действие фосфатидилхолиновых липосом: у больных 1-й, 2-й и 3-й групп уровень TNF- α в культуральной среде в сравнении с опытом 3 существенно снижается (на 22,2–29,6%, $p_3 < 0,001$).

Результаты исследования влияния фосфатидилхолиновых липосом на LPS-индуцированную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза провоспалительного цитокина IL-1 β клетками эпителия бронхов у больных 1-й, 2-й и 3-й групп представлены в таблице 2.

Нами установлено (табл. 2), что у больных 1-й и 2-й групп под влиянием введения в культуральную среду взвеси мононуклеарных лейкоцитов (опыт 2) уровень IL-1 β в супернатанте культуры клеток бронхиального эпителия статистически значимо возрастает соответственно на 17,0% ($p_1 < 0,01$) и 17,0% ($p_1 < 0,01$).

У больных же ХОЗЛ III степени тяжести, протекающим в сочетании с анемическим синдромом более выраженным, чем у больных 2-й группы, достоверной динамики уровня IL-1 β в супернатанте культуры клеток бронхиального эпителия под влиянием введения аутологичных мононуклеаров нами не выявлено. В экспериментальной модели под влиянием преинкубации мононуклеаров с LPS (опыт 3) исследованный показатель статистически значимо возрастает только у больных 2-й и 3-й групп (соответственно на 19,0%, $p_2 < 0,01$ и 12,9%, $p_2 < 0,05$). В инкубационной модели с липином (опыт 4) исследованный показатель у больных 1-й, 2-й и 3-й группы снижается в сравнении с опытом 3 соответственно на 17,9%, 21,7% и 17,7%, $p_3 < 0,01$).

Таким образом, у больных 1-й, 2-й и 3-й групп выявлено модулирующее лейкоцито-зависимый синтез цитокина IL-1 β действие фосфатидилхолиновых липосом.

Таблица 2

Влияние фосфатидилхолиновых липосом на LPS-индуцированную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза IL-1 β клетками эпителия бронхов у больных 1-й, 2-й и 3-й групп, пг/мл

Группа	Стат. показ.	1-я группа Больные ХОЗЛ без анемии, I-II степени тяжести, санаторно-курортный этап лечения	2-я группа Больные ХОЗЛ с нормохромной и нормоцитарной анемией, I-II степени тяжести, санаторно-курортный этап лечения	3-я группа Больные ХОЗЛ с нормохромной и нормоцитарной анемией, III степень тяжести, фтизиопульмонологический стационар
Опыт 1 (уровень TGF- β 1 в культуральной среде)	M \pm m n p	29,47 \pm 1,11 20 –	33,12 \pm 1,15 20 < 0,05	37,70 \pm 1,67 12 < 0,001
Опыт 2 (в культуральную среду вводится взвесь аутологичных мононуклеаров)	M \pm m n p p ₁	34,65 \pm 1,34 20 – < 0,01	38,34 \pm 1,55 20 < 0,1 < 0,02	42,50 \pm 1,77 12 < 0,001 < 0,1
Опыт 3 (преинкубация мононуклеаров с LPS отмывание клеток в культуральную среду)	M \pm m n p p ₁ p ₂	38,63 \pm 1,92 20 – < 0,001 < 0,1	45,61 \pm 1,79 20 < 0,01 < 0,001 < 0,01	48,00 \pm 1,93 12 < 0,001 < 0,001 < 0,05
Опыт 4 (преинкубация мононуклеаров с LPS отмывание клеток инкубация клеток с липином в культуральную среду)	M \pm m n p p ₁ p ₂ p ₃	31,70 \pm 1,40 20 – < 0,5 < 0,2 < 0,01	35,69 \pm 1,90 20 < 0,1 < 0,5 < 0,5 < 0,001	39,49 \pm 1,79 12 < 0,001 < 0,2 < 0,5 < 0,01

Примечание: p – достоверность различий, высчитанная в сравнении с 1-й группой больных в соответствующем опыте, p₁ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с опытом 1 в той же группе больных, p₂ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с опытом 2 в той же группе больных, p₃ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с опытом 3 в той же группе больных.

ВЫВОД

Особенностью патогенеза ХОЗЛ у больных с анемическим синдромом (перенесших ТВС легких) является особая форма регенераторно-пластической недостаточности, характеризующаяся достоверно более высоким синтезом клетками бронхиального эпителия провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β , что формирует патофизиологический базис для нарастания как регионарной (стенки бронхов), так и системной воспалительной реакции и прогрессирования фиброза легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоглазов В.А. Роль эндотоксина грамотрицательной флоры кишечника в формировании нарушений иммунитета и гемостаза у больных бронхо-обструктивным синдромом / В.А.Белоглазов - I национальный конгресс Украины з імунології, алергології та імунореабілітації: Збірка тез. – Алушта, 1998. – С.153.
2. Варбанец Л.Д. Эндотоксины грамотрицатель-

ных бактерий: структура и биологическая роль / Л.Д.Варбанец. - Мікробіол. журнал. – 1994. – Т. 56, №3. – С.76-97.

3. Захарова И.Я. Эндотоксины – О-антигены кишечной палочки. – Киев: Наукова думка, 1980. – 207 с.

4. Лурия Е.А. Органные культуры кроветворной и лимфоидной ткани: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук: 03.099. / Академия мед. наук СССР. – М., 1972. – 37 с.

5. Bacterial lipopolysaccharide-induced sulfido-leukotriene release from peripheral blood leukocytes in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease / M.Kraus-Filarska, J.Malolepszy, W.Medrala, R. Dobek. - J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. – 1997. – Vol.8, №2. – P.94-97.

6. Barnes P.J. Chronic obstructive pulmonary disease / P.J.Barnes. - N. Engl. J. Med. - 2000. - Vol.343. - P.269–280.

7. Essential role of platelet-derived growth factor receptor Alpha in the development of the intraplacental

yolk / Y.Ogura, N.Takakura, H.Yoshida, S.Nishikawa / Biol. Reprod. - 2002. - Vol.58, N.1. - P.65-72.

8. Local lung responses following endobronchial elastase and lipopolysaccharide instillation in sheep / [Collie D.D., McLean N., Sallenave J.M. et al.] - Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. - 2006. - Vol. 1, N.2. - P.189-199.

9. The association between chronic obstructive

pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta - analysis / W.Q.Gan, S.F Man., A.Senthilselvan, D.D.Sin - Thorax. – 2004. - Vol.59. - P.574-580.

10. Westphal O. Bacterial endotoxins: chemical and clinical aspects / Weinheim. – 1984. – P. 1-10.