

© Нгема О.Н., 2009  
УДК 616.34+616-099+616-002.4+616-006:577.352.24-053.2

О.Н. Нгема

## ВПЛИВ ФОСФАТИДИЛХОЛІНОВИХ ЛІПОСОМ НА LPS-ІНДУКОВАНИЙ СИНТЕЗ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ- $\alpha$ МОНОНУКЛЕАРНИМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПРИ КИШКОВОМУ ТОКСИКОЗІ У ДІТЕЙ

Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського

*У дітей, хворих на гострі кишкові захворювання (ГКЗ) середнього і тяжкого ступеня, вивчено рівень фактора некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) у середовищі культури клітин мононуклеарних лейкоцитів. Встановлено, що під впливом LPS-стимулу у таких хворих поглиблюється дисбаланс цитокінового гомеостазу – зростає синтез мононуклеарними лейкоцитами прозапального цитокіну TNF- $\alpha$ , а також забезпечується модулювальний вплив на цей процес фосфатидилхолінових ліпосом.*

**Ключові слова:** фосфатидилхолінові ліпосоми, чинник некрозу пухлини-альфа, кишковий токсикоз у дітей.

У сучасному вченні про синдром інфекційного токсикозу важливу патогенетичну роль у розвитку гострої неспецифічної запальної реакції на інфекційний агент відводять системі цитокінів, що контролює процеси реалізації імунної і запальної реактивності [1]. Так, порушення водно-електролітного, енергетичного балансу та кислотно-лужного стану, а також неврологічні розлади, що розвиваються при ГКЗ у дітей, розглядають у тому числі і з позиції синдрому системної запальної відповіді (SIRS), що асоціюється з накопиченням прозапальних цитокінів у крові і реалізацією їх дистантних ефектів (на віддалі від первинного вогнища пошкодження) [1, 2].

Підтвердженням цієї концепції є наукові факти, які свідчать, що при розвитку SIRS рівні окремих прозапальних цитокінів зростають в 5-10 і більше разів і деструктивні ефекти цитокінів та інших медіаторів можуть домінувати, що призводить до порушення проникливості і функції ендотелю капілярів, розвитку поліорганної дисфункції і синдрому ДВЗ [3-5].

Відомо також, що основними продуцентами цитокінів є Т-клітини, активовані моноцити/мак-

рофаги та інші види лейкоцитів, ендотеліоцити пост-капілярних венул, тромбоцити і різні типи стромальних клітин [6-8].

У зв'язку з цим особливі надії на підвищення ефективності лікування токсикозу пов'язують із патологіологічним обґрунтуванням використання лікарських засобів з антицитокіновою активністю.

Загальною метою дослідження є наукове обґрунтування доцільності використання і оцінка клінічної ефективності вживання фосфатидилхолінових ліпосом (ліпіну) для корекції дисбалансу цитокінового гомеостазу в комплексному лікуванні інфекційного токсикозу різного генезу у дітей. У роботі представлено результати дослідження у подібних хворих особливостей функціональної активності (синтез прозапальних цитокінів) лейкоцитів у вітральних культуральних експериментальних моделях.

### Пацієнти і методи

Обстежено 26 хворих на ГКЗ, які перебували на лікуванні в дитячій інфекційній лікарні м. Сімферополя. У всіх обстежених осіб під час ушпиталення зареєстровано розвиток токсикозу: середнього (11 хворих – 1-а група), тяжкого (9 хворих – 2-а група) і тяжкого ступеня з ексикозом (6 хворих – 3-я група).

Концентрацію TNF- $\alpha$  у культуральному середовищі культури клітин мононуклеарних лейкоцитів визначали імуноферментним методом з використанням комерційних наборів «ІФА-TNF-ALPHA» (ТОВ «Цитокін»). При дослідженні культуральних рідин для розведення стандартів використано культуральне середовище. Оцінку результатів здійснювали фотометрично.

Культивацію клітин мононуклеарних лейкоцитів проводили в експериментальній моделі короткострокової культури клітин за Лурія Е.А. (1972) [9]. Ставили також експерименти з визначенням рівня TNF- $\alpha$  у культуральному середовищі без і з інкубацією культивованих клітин

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

з бактерійним ліпополісахаридом (LPS) (у дозі 10,0 мкг/мл [1]) і фосфатидилхоліновими ліпосомами (препарат ліпін (у дозі 0,01 мкг/мл) виробництва «Біолек», Харків). LPS отримували зі штамів *E. coli* K 30 і C 600 (*lux*)(*R*-мутанти) за методом Westphal O. (1984) [10]. М'який гідроліз нативного ЛПС здійснювали оцтовою кислотою [11].

### Результати досліджень та їх обговорення

Результати дослідження рівня TNF- $\alpha$  у культуральному середовищі культури клітин мононуклеарних лейкоцитів у хворих 1-ї, 2-ї і 3-ї груп представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Рівень TNF- $\alpha$  у середовищі культури клітин мононуклеарних лейкоцитів обстежених хворих, пг/мл культурального середовища

Група	Статистичний показник	1-а група	2-а група	3-я група
Експеримент 1 (рівень TNF- $\alpha$ у культуральному середовищі)	M $\pm$ m	11,07 $\pm$ 0,70	22,04 $\pm$ 1,21	39,73 $\pm$ 2,08
	n	11	9	6
	p	–	–	–
	p <sub>1</sub>	–	<0,001	<0,001
	p <sub>2</sub>	–	–	<0,001
Експеримент 2 (передінкубація клітин з LPS перед початком культивування)	M $\pm$ m	19,22 $\pm$ 0,94	35,41 $\pm$ 1,19	56,17 $\pm$ 1,89
	n	11	9	6
	p	<0,001	<0,001	<0,001
	p <sub>1</sub>	–	<0,001	<0,001
	p <sub>2</sub>	–	–	<0,001
Експеримент 3 (передінкубація клітин з LPS + ліпін в культуральне середовище перед початком культивування)	M $\pm$ m	13,50 $\pm$ 0,91	26,11 $\pm$ 1,32	42,31 $\pm$ 2,65
	n	11	9	6
	p	<0,05	<0,05	<0,5
	p <sub>1</sub>	–	<0,001	<0,001
	p <sub>2</sub>	–	–	<0,001

Примітки: p – достовірність відмінностей, вирахована порівняно з експериментом 1 в тій же групі хворих; p<sub>1</sub> – порівняно з 1-ю групою хворих у відповідному експерименті; p<sub>2</sub> – порівняно з 2-ю групою хворих у відповідному експерименті.

TNF- $\alpha$  відносять до прозапальних цитокінів, що відіграють, з одного боку, істотну патогенетичну роль у прогресі запального процесу, з іншого, – що має протибактерійну активність за рахунок забезпечення зв'язку між активованими мононуклеарними фагоцитами і Т-лімфоцитами [8]. Крім цього, TNF- $\alpha$  активно впливає на диференціювання макрофагів і стимулює фагоцитоз [12].

У хворих 1-ї групи під впливом передінкубації клітин з LPS має місце підвищення рівня прозапального цитокіну TNF- $\alpha$  у культуральному середовищі на 73,6 % (p<0,001), у хворих 2-ї і 3-ї груп – відповідно на 60,7 % (p<0,001) і на 41,4 % (p<0,001). Таким чином, можна припустити, що під впливом бактерійної ендотоксинемії у хворих на ГКЗ із середнім і тяжким ступенем наростає лейкоцит(лімфоцит)-опосередкований дисбаланс цитокінового гомеостазу, зростає синтез прозапального цитокіну TNF- $\alpha$  мононуклеарними лейкоцитами.

Науковою аргументацією включення в експериментальну культуральну модель ліпину є факти, які дозволяють стверджувати, що використання

ліпосомальної форми фосфатидилхоліну (підвищена концентрація якого спостерігається в клітинах таких життєво важливих органів, як легені, серцевий м'яз, головний і спинний мозок, печінка, кишечник і ін.) дає змогу отримати додаткові біологічні ефекти: модуляція дисбалансу імунної відповіді шляхом утворення специфічних імуноглобулінів; відновлення і стабілізація складу і структури біологічних мембран клітин при порушеннях метаболічних процесів; виведення патогенних речовин і токсичних продуктів з органів і тканин за допомогою ліпідних молекул з метою нормалізації обмінних процесів; додаткове забезпечення енергією метаболічних реакцій у процесі життєдіяльності клітин [13-18].

Нами встановлено, що під впливом введення в культуральне середовище фосфатидилхолінових ліпосом (ліпину) рівень прозапального цитокіну TNF- $\alpha$  у культуральному середовищі істотно знижується аж до повернення до початкового (в експерименті 1) рівня у хворих 3-ї групи. Таким чином, встановлено, що імуноактивна дія фосфатидилхолінових ліпосом (екстраімунний імуномо-

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

дулятор) зменшує синтез прозапального цитокіну TNF- $\alpha$  мононуклеарними лейкоцитами.

### Висновки

1. Наявність токсикозу у хворих на ГКЗ середнього і важкого ступеня характеризується статистично значущим поглибленням дисбалансу цитокінового гомеостазу – зростанням синтезу мононуклеарними лейкоцитами прозапального цитокіну TNF- $\alpha$ , що формує умови для наростання системної запальної відповіді.

2. Встановлено, що імуноактивна дія фосфатидилхолінових ліпосом (екстраімунний імунодулятор) зменшує синтез TNF- $\alpha$  мононуклеарними лейкоцитами.

### Література

1. Lymphocyte activation by Concanavalin A / Moller G., Yammarstrom L., Moller E. et al. // Proceedings of the Fourth European Immunology Meeting. – Budapest, 1978. – P. 210.
2. Bone R.C. Toward an epidemiology and natural history of SIRS // JAMA. – 1999. – V. 268. – P. 3452-3455.
3. 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 // Crit. Care Med. – 1996. – V. 24. – P. 163-172.
4. Mainous M., Ertel W., Chaudary I. The gut: a cytokine – generating organ in systemic inflammation // Shock. – 1995. – V. 4. – P. 193-209.
5. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients / Rodriges M., Santolaria F., Jarque A. et al. // Cytokine. – 2001. – V. 15. – P. 232-236.
6. Воспаление: Руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
7. 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.
8. Hurley J.V. Acute inflammation. – Baltimor: Williams and Wilkins Co, 1998. – 374 p.
9. Лурия Е.А. Органые культуры кроветворной и лимфоидной ткани: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – М., 1972. – 37 с.
10. Westphal O. Bacterial endotoxins: chemical and clinical aspects. – Weinheim, 1984. – P. 1-10.

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

12. Sanbery A.L. Cellular functions in immunity and inflammation // Ann. Rev. Biochem. – 1999. – V. 11. – P. 272-292.

13. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы. – М.: Издательский дом «Русский врач», 2001. – 396 с.

14. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. – М.: Издательский дом «Русский врач», 1998. – 296 с.

15. Bula D., Ghaly E. Liposome delivery systems // Drug. Dev. Ind. Pharm. – 1999. – V. 21, N 14. – P. 1621-1629.

16. Crowe I.H., Crowe L.M., Chapman D. Liposomes: preparation, characterization and preservation // Science. – 1998. – V. 223, N 5. – P. 701-703.

17. Интерлейкин-1 при острых кишечных инфекциях у детей / Мощич О.П., Крамарев С.О., Корбут О.В., Шпак І.В. // Інфекційні хвороби. – 2004. – № 1. – С. 77-78.

18. Lipid membrane structures / Hirota S., Kikuchi H., Yamauchi H., Tomiawa M. // United States Patent. – 1990. – P. 496-598.

## INFLUENCE OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOMES ON LPS-INDUCED SYNTHESIS OF TNF- $\alpha$ BY MONONUCLEAR LEUKOCYTES AT INTESTINAL TOXICOSIS IN CHILDREN

O.N. Nhema

*SUMMARY. It was studied a level of TNF- $\alpha$  in medium of culture of leukocytes mononuclear cells in children with acute intestinal diseases (AID) with middle-severe and severe clinical course. It was determined that deepening of imbalance of cytokine homeostasis takes place – the synthesis of pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  increases by mononuclear leukocytes under influence of LPS-stimulus in patients with AID, and modulating influence of phosphatidylcholine liposomes on this process is provided.*

**Key words:** phosphatidylcholine liposomes, TNF- $\alpha$ , intestinal toxicosis in children.