

ХЕМОТАКСИС ФАГОЦИТОВ: ЗНАЧЕНИЕ В ПОДБОРЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ДОЗЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ЛОКОМОТОРНЫХ ДИСФУНКЦИЙ ФАГОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ТРАВМОЙ

Злакоманова О.Н., Зурочка А.В., Чукичев А.В.

Кафедра детской хирургии и Научно-исследовательский институт иммунологии
Челябинской государственной медицинской академии, г. Челябинск

Резюме. В статье излагается оригинальный подход в подборе индивидуальной дозы и оценки эффективности лекарственного препарата в лечении детей с травмой, базирующийся на изучении локомоторной функции фагоцитов.

Ключевые слова: хемотаксис, фагоциты, травма, дети, иммунокоррекция.

Zlakomanova O.N., Zurochka A.V., Chukichev A.V.

CHEMOTAXIS OF PHAGOCYTES IS SIGNIFICANT IN ESTIMATION OF INDIVIDUAL DOSAGE OF DRUGS FOR CORRECTION OF LOCOMOTIVE PHAGOCYTE DISFUNCTIONS IN CHILDREN WITH TRAUMA

Abstract. The article considers an original approach to individual dose selection and efficiency evaluation of immunity-targeted drugs applied for treatment of children with trauma, based on examination of phagocyte locomotive functions. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 479-492)

Введение

В последние десятилетия отмечается устойчивая тенденция к росту травматизма, что определяет актуальность данной медицинской проблемы. Около 25% пациентов с травмой составляют дети, механическая травма у которых выступает на первое место как причина заболеваемости, инвалидности и смертности. Посттравматические состояния, приводящие к инвалидности, наблюдаются у 4,5%, а длительные функциональ-

ные расстройства, затрудняющие учебу, — у 38% детей [11].

Накопленные фактические данные свидетельствуют о том, что закономерным следствием травмы являются изменения со стороны иммунной системы. Несмотря на непрерывное совершенствование антибактериальной терапии и хирургической техники, инфекционные осложнения, являющиеся одними из основных клинических проявлений иммунной недостаточности, остаются главной причиной смерти пациентов, особенно детей, с серьезными повреждениями опорно-двигательного аппарата [9].

Нейтрофилы и моноциты играют важнейшую роль в противомикробной защите организма, направляясь одними из первых в очаг тканевой деструкции. От того насколько эф-

Адрес для переписки:

Злакоманова Ольга Николаевна
г. Челябинск, ул. Ворошилова, д. 57 Б, кв. 78.
Тел.: (351) 798-56-86 (дом.); (351) 232-02-85 (раб.);
8 922-70-90-913 (сот).
Факс: (351) 260-71-54, 778-01-71.

фективны в этот период механизмы направленного движения фагоцитов, во многом зависят дальнейшее течение и исход травматической болезни [4, 5, 8, 13, 15, 16, 21]. Это положение было полностью подтверждено и результатами наших исследований [7], которые показали, что дефекты целенаправленной миграции нейтрофилов и моноцитов, развивающиеся после механической травмы, являются одной из важных причин развития гнойно-воспалительного процесса.

Полученные данные акцентировали наше внимание на необходимости поиска и разработки методов коррекции выявленных дефектов миграционной активности фагоцитов. Это обусловлено тем, что эмпирический подход к иммунокоррекции является недостаточно эффективным. По данным ряда авторов [17, 19], такое применение иммунопрепаратов эффективно в 67-75% наблюдений. Ориентация в определении показаний к иммунотерапии на исходно сниженный уровень иммунологических показателей также не позволяет в полной мере получить желаемого результата. Поэтому для объективизации показаний к назначению иммуномодуляторов рекомендуется целенаправленно изучать эффекты иммуномодулирующей терапии и разрабатывать более совершенные и чувствительные методы лабораторного прогнозирования эффективности иммунопрепаратов.

Необходимо отметить, что изучение хемотаксиса фагоцитов многими исследователями использовалось в качестве косвенного показателя оценки иммуностропной эффективности лекарственных препаратов [2, 19]. Оценка степени активации хемотаксиса фагоцитов под влиянием препарата и определение на основании этого наиболее эффективной его дозы встречаются только в работе одного автора [18].

Многие иммуностропные препараты обладают амбивалентным действием на иммунную систему. Направленность действия иммуномодулирующего агента (супрессия или стимуляция) может зависеть как от дозы препарата, так и от исходного состояния иммунной системы больного [11]. В этой связи, по мнению Е.Н. Соколова и соавт., при использовании препаратов с иммуностропной активностью, помимо лабораторных исследований иммунного статуса больного, необходимо проводить индивидуальный подбор препаратов в тестах *in vitro* с клетками крови больного. Учитывая это, мы поставили перед собой ряд задач:

1) изучить направленное движение нейтрофилов и моноцитов периферической крови детей в остром периоде травматической болезни к С5а-компоненту комплемента под воздействи-

ем различных концентраций иммуностропных препаратов *in vitro*;

2) сопоставить полученные данные *in vitro* с характером изменения целенаправленной двигательной активности фагоцитов после применения максимально эффективной дозы у больных;

3) оценить клиническое значение подбора эффективной индивидуальной дозы препарата для коррекции двигательных нарушений фагоцитов у детей с травматической болезнью.

Материалы и методы

Под наблюдением находился 91 ребенок с механической травмой в возрасте от 6 до 14 лет. Исследования проведены в острый период травматической болезни. Референтную группу составили 30 здоровых детей того же возраста. Все пациенты были разделены на 4 группы:

- I группа — 21 ребенок — контрольная (с традиционным лечением);
- II группа — 30 детей, получавших на фоне традиционного лечения метилурацил (М);
- III группа — 15 детей, получавших нуклеинат натрия (НН);
- IV группа — 25 детей, получавших АТФ.

Для коррекции двигательных дисфункций фагоцитов нами были использованы метилурацил, нуклеинат натрия и АТФ (аденозинтрифосфорная кислота).

Нуклеинат натрия — натриевая соль нуклеиновой кислоты, обладает широким спектром биологической активности.

Метилурацил, как и другие пиримидиновые производные, является препаратом системного иммуномодулирующего действия, что предполагает реализацию его иммуностропного эффекта через универсальные механизмы внутриклеточной регуляции (вторичные мессенджеры). Эти эффекторные системы лишены тканевой и видовой специфичности [14]. Наиболее изучены две системы передачи внешнего сигнала внутрь клетки: аденилатциклазная и Ca^{2+} -полифосфоинозитольная [10]. Аденилатциклаза (АЦ) обнаруживается, главным образом, в клеточных мембранах и является ферментом, расщепляющим АТФ до цАМФ и пироглутамата. Как известно, повышение концентрации цАМФ тормозит направленную миграцию клеток [13]. Метилурацил угнетает активность АЦ, предотвращая повышение концентрации цАМФ и стимулируя хемотаксис.

АТФ, в силу активного использования его в терапии, вызывает интерес к исследованию его действия на иммуногенез. Участие АТФ в иммуномодуляции освящено в немногочисленных работах. По интересующей нас теме, мы стол-

кнулись лишь с несколькими исследованиями, посвященными изучению роли АТФ в формировании хемотаксического ответа клеток.

Известно, что процесс связывания нейтрофилами одного из хемотаксических факторов — формилметиониллейцилфенилаланина сопровождается усилением аэробного фосфорилирования на поверхности клеток и генерацией мембраносвязанного АТФ [3]. Следовательно, процесс трансмембранной передачи сигнала к хемотаксису требует затраты энергии в виде АТФ.

Учитывая вышеизложенное, нами была предпринята попытка лабораторного прогнозирования эффективности АТФ как возможного кинетикотропного средства.

Разработанный нами способ оценки хемокинетикотропной активности нуклеината натрия, метилурацила и аденозинтрифосфорной кислоты, основанный на предварительном определении изменения кинетической активности нейтрофилов и моноцитов под воздействием препаратов *in vitro*, был применен для прогнозирования терапевтического эффекта.

Описание способа. У больного проводили забор крови из вены и методом, предложенным [21], получали нейтрофилы или моноциты. Хемотаксис нейтрофилов или моноцитов изучали под агарозой по методу [20]. Клеточную взвесь доводили до концентрации 10^8 клеток/мл и делили на 5 равных частей, которые размещали в лунках агарозного геля в объеме 0,02 мл. Одну часть клеток использовали для исследования хемотаксической активности фагоцитов к стандартному хемоаттрактанту — С5а-компоненту комплемента сыворотки, активированного зимозаном, который размещали во все периферические лунки (контроль). В центральную лунку вносили среду 199, а к клеткам, размещенным в средних лунках, добавляли М, НН, АТФ в различных концентрациях (опыт). Концентрации исследуемых препаратов были рассчитаны с учетом их среднесуточных доз и составили: для М — 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 мг/мл среды 199, для НН — 0,3; 0,23; 0,15; 0,03 мг/мл, для АТФ — 1,0; 0,75; 0,5; 0,1 мг/мл. После 3-х (для нейтрофилов) 18-ти (для моноцитов) часовой инкубации оценивалось изменение индекса хемотаксиса до инкубации к аналогичному показателю после инкубации клеток с препаратом.

В дальнейшем при лечении детей использовалась доза, которая *in vitro* вызывала максимальную инициацию двигательной активности как нейтрофилов, так и моноцитов. Расчет индивидуальной дозы препарата осуществля-

ли по формуле, предложенной А.В. Чукичевым [18].

Результаты и обсуждение

Прежде чем приступить к изучению влияния М, НН, АТФ на кинетическую функцию нейтрофилов и моноцитов периферической крови, важно было определить, будет ли изменяться хемотаксис фагоцитов под влиянием различных концентраций этих препаратов в том случае, если исходный уровень данной функции не нарушен. Для этого мы, в первую очередь, исследовали действие препаратов *in vitro* на фагоциты здоровых детей.

Как видно из таблицы 1, почти у всех здоровых детей исследуемые препараты вызывали *in vitro* снижение целенаправленной двигательной активности нейтрофилов. Только в единичных случаях (9 из 120 реакций) мы наблюдали стимуляцию хемотаксиса клеток, причем преимущественно под влиянием малых концентраций препаратов (7 из 9). И это касалось воздействия метилурацила и нуклеината натрия. Установленный факт косвенно свидетельствует о нецелесообразности применения изучаемых препаратов при нормальном уровне локомоторной активности нейтрофилов, а также о необходимости предварительного лабораторного тестирования эффективности препаратов в каждом конкретном случае.

Исследование влияния метилурацила на миграционную функцию фагоцитов

При исследовании кинетикотропных эффектов М нами были получены следующие результаты. У всех 30 детей с травматической болезнью, у которых в последующем был применен М, в острый период обнаружено достоверное ($p < 0,001$) снижение исходного уровня хемотаксиса нейтрофилов к стандартному хемоаттрактанту (С5а-компоненту комплемента) в 1,67 раза, а моноцитов — в 1,86 раза в сравнении со здоровыми детьми. Добавление к взвеси нейтрофилов и моноцитов различных концентраций метилурацила приводило к неоднозначному изменению хемотаксического ответа клеток к С5а. Концентрация препарата — 0,5 мг/мл оказывала максимальный стимулирующий эффект на сниженную локомоторную функцию нейтрофилов в 21 наблюдении (табл. 2, 3). Из них у 9 пациентов хемотаксическая активность нейтрофилов усиливалась и под влиянием более высоких концентраций М. Однако ее уровень не достигал величины показателей хемотаксиса, индуцированного минимальной дозой препарата. Высокие концентрации М либо не оказывали влия-

ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКС ХЕМОТАКСИСА НЕЙТРОФИЛОВ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ К С5а-КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АТФ, НУКЛЕИНАТА НАТРИЯ И МЕТИЛУРАЦИЛА *IN VITRO* (n = 30)

Больные	Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а (усл. ед.) под действием различных концентраций препарата				Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а (контроль)
	Концентрация препаратов, (мг/мл)				
	1,0	0,75	0,5	0,1	
АТФ					
A	1,280	1,500	1,250	1,750	2,025
B	1,063	2,000	2,273	2,235	2,350
C	1,000	1,300	1,444	1,300	1,800
D	0,933	1,200	1,333	1,042	2,000
E	1,600	0,960	1,333	2,113	2,125
F	0,833	1,556	1,154	1,400	2,500
G	1,500	1,000	0,833	1,545	2,000
H	1,300	1,200	1,176	1,200	1,923
I	0,800	1,000	1,200	1,400	1,899
J	1,000	1,200	1,000	1,300	2,273
Нуклеинат натрия					
	0,3	0,23	0,15	0,03	
A	2,400	1,733	1,625	2,800	2,589
B	1,111	0,840	2,206	1,122	2,750
C	1,354	1,264	1,741	1,980	2,200
D	0,500	1,520	2,081	2,560	2,143
E	1,200	0,818	1,273	2,600	2,000
F	1,667	2,000	1,600	1,667	2,457
G	1,000	1,567	1,000	2,000	2,273
H	1,600	2,000	1,000	1,452	2,125
I	1,354	1,200	1,333	1,600	2,500
J	1,667	1,520	1,333	1,122	2,350
Метилурацил					
	2,0	1,5	1,0	0,5	
A	1,393	1,491	1,935	1,588	2,535
B	1,353	0,680	1,115	1,385	2,000
C	1,110	0,680	3,000	1,222	1,923
D	1,000	2,000	2,500	0,750	2,125
E	1,429	1,250	1,333	2,666	2,800
F	1,325	0,583	1,000	2,000	1,923
G	1,867	2,471	3,000	1,429	2,350
H	1,667	2,000	1,600	1,667	2,500
I	2,400	1,333	1,600	1,286	2,000
J	1,600	2,000	1,429	1,667	2,143

Примечание: жирным шрифтом в этой и последующих таблицах выделены значения индекса хемотаксиса, уровень которых был ниже контрольного.

ТАБЛИЦА 2. ИНДЕКС ХЕМОТАКСИСА НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ К С5а-КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕТИЛУРАЦИЛА *IN VITRO* ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (n = 30)

Больные	Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а (усл. ед.) под действием различных концентраций метилурацила				Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а до коррекции (усл. ед.)	Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а после коррекции (усл. ед.)
	Концентрация метилурацила, мг/мл					
	2,0	1,5	1,0	0,5		
A	1,263	1,270	1,833	2,607	0,777	2,750
B	3,000	0,750	1,000	3,466	1,522	3,466
C	1,071	1,200	1,333	1,333	0,952	3,950
D	1,333	1,538	1,833	1,778	1,364	2,500
E	1,333	1,300	1,400	1,800	0,947	2,500
F	1,750	1,600	1,667	2,826	1,500	2,826
G	0,667	0,643	1,077	1,769	1,200	2,353
H	2,000	1,000	1,333	2,667	1,208	2,667
I	1,067	1,667	1,412	2,000	1,200	2,420
J	3,333	1,429	0,556	3,333	1,500	3,333
K	0,889	1,833	2,889	1,469	1,111	3,000
L	1,400	1,389	1,364	2,382	1,722	2,500
M	1,909	1,750	1,250	2,500	1,111	2,650
N	1,333	0,400	3,200	2,000	1,333	3,200
O	2,865	2,800	2,965	1,500	1,705	2,733
P	2,133	1,750	2,700	1,333	1,429	2,700
Q	1,280	1,700	1,778	1,500	1,250	2,569
R	1,500	1,000	0,750	2,000	1,200	3,000
S	1,875	2,167	1,700	2,500	1,071	2,143
T	1,455	2,200	1,333	2,500	1,000	4,000
U	2,000	0,947	0,840	2,500	0,777	2,750
V	0,649	0,700	1,333	2,000	1,250	3,950
W	0,900	1,500	1,071	1,750	1,182	2,529
X	1,364	2,000	0,625	2,400	1,462	2,733
Y	1,333	1,250	1,185	2,500	1,154	2,544
Z	2,000	1,000	1,400	2,333	1,533	2,568
A1	1,200	1,522	1,583	2,500	1,600	2,529
B1	1,200	1,500	0,571	2,000	1,500	6,000
C1	1,300	1,857	0,800	2,154	1,429	3,514
D1	1,500	1,818	1,000	1,895	1,300	2,381
				Норма: 2,09±0,10		

ТАБЛИЦА 3. ИНДЕКС ХЕМОТАКСИСА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ К C5a-КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕТИЛУРАЦИЛА *IN VITRO* ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (n = 30)

Больные	Индекс хемотаксиса моноцитов к C5a (усл. ед.) под действием различных концентраций метилурацила				Индекс хемотаксиса моноцитов к C5a до коррекции (усл. ед.)	Индекс хемотаксиса моноцитов к C5a после коррекции (усл. ед.)
	Концентрация метилурацила, мг/мл					
	2,0	1,5	1,0	0,5		
A	0,900	1,000	1,500	1,429	1,000	1,700
B	1,429	0,556	2,000	1,154	1,000	2,000
C	2,333	1,333	2,700	2,400	1,000	3,000
D	1,000	2,143	2,167	2,500	1,250	2,600
E	1,500	1,300	0,833	2,000	1,250	2,000
F	1,250	0,714	1,111	1,500	1,111	1,679
G	1,429	1,500	1,250	3,000	1,000	3,000
H	1,333	1,333	1,000	2,000	1,250	2,281
I	0,875	0,714	1,125	1,750	1,286	2,275
J	1,667	1,200	2,111	1,083	1,400	2,111
K	1,429	1,667	2,250	1,000	0,600	1,856
L	1,429	2,000	1,000	2,333	1,667	2,500
M	1,000	0,800	1,750	1,250	1,250	2,222
N	1,500	1,429	1,857	1,143	1,333	2,275
O	1,429	1,000	1,167	2,000	0,800	3,000
P	1,167	1,100	0,555	2,000	1,000	2,000
Q	1,429	1,667	1,857	1,429	0,800	2,000
R	1,143	1,200	3,000	1,333	1,000	3,000
S	1,143	1,500	1,800	1,800	1,167	1,800
T	1,250	1,000	0,800	2,000	1,111	2,000
U	1,280	1,286	1,200	1,700	1,167	1,700
V	1,154	1,300	1,800	1,500	1,600	2,222
W	1,429	1,000	1,444	1,714	1,333	1,875
X	1,273	1,222	1,300	2,125	1,333	3,000
Y	1,000	0,800	1,333	1,667	1,200	1,667
Z	1,286	1,429	2,600	3,333	1,429	3,333
A1	0,700	1,714	1,000	3,000	1,154	3,000
B1	1,300	1,300	1,000	1,714	1,444	2,500
C1	1,429	1,250	1,667	1,750	1,300	2,143
D1	1,300	1,429	1,714	1,429	1,200	2,610
				Норма: 2 20±0 1		

ния на локомоторную функцию данных клеток, либо еще в большей степени ее угнетали.

У двух детей мы наблюдали одинаково выраженную стимуляцию хемотаксиса нейтрофилов на две концентрации препарата. В этом случае при расчете лечебной дозы мы отдавали предпочтение минимальной концентрации препарата.

Наиболее выраженная стимуляция хемотаксической активности моноцитов была также отмечена у 19 пациентов этой группы при добавлении к взвеси клеток М в концентрации 0,5 мг/мл. И только у 5 из них повышение целенаправленной миграции вызывали большие концентрации тестируемого препарата. При этом усиление хемотаксиса было менее выражено, чем при применении минимальной концентрации метилурацила. Концентрация препарата 1,0 мг/мл вызывала значимую стимуляцию только у 7 детей, а более высокие дозы еще реже — в 2 случаях. У 5 детей высокие концентрации препарата не имели эффекта.

Восстановление хемотаксиса фагоцитов периферической крови под действием той или иной концентрации метилурацила *in vitro* мы расценивали как критерий, отражающий положительное действие этого препарата в указанной дозе. Поэтому в выборе дозы для лечения пациентов мы ориентировались на максимальный уровень инвитровой стимуляции хемотаксической функции нейтрофилов. Как правило, это были низкие концентрации препарата (в 93% случаев).

Согласно формуле [18], мы определяли индивидуальные дозы метилурацила для лечения больных и назначали их *per os*, трехкратно в течение 10 дней. После этого у больных повторно исследовалась кинетическая функция фагоцитов.

При анализе результатов применения индивидуально подобранных доз метилурацила в 96,67% случаев было отмечено совпадение действия препарата *in vitro* и *in vivo* на модели нейтрофилов и в 93,33% случаев — на модели моноцитов.

В качестве иллюстрации использования хемотаксической реакции иммунокомпетентных клеток для прогноза максимальной эффективности кинетикотропного действия метилурацила приводим следующий пример.

Больная А, 9 лет, поступила в отделение детской ортопедии и травматологии Челябинской областной клинической больницы через 21 час после получения травмы с диагнозом: закрытый аддукционный перелом хирургической

шейки правого плеча со смещением костных отломков по длине на 1,5 см. В экстренном порядке проведена спица Киршнера через надмышечковую область правой плечевой кости и наложена скоба ЦИТО для скелетного вытяжения грузом в 3 кг. При иммунологическом обследовании у данного ребенка выявлено снижение хемотаксической активности нейтрофилов в 1,37 раза, моноцитов — в 1,91 раза по сравнению с нормальными показателями. После проведения предварительного тестирования М *in vitro* с нейтрофилами и моноцитами больного наиболее выраженная стимуляция хемотаксиса данных клеток отмечена под действием минимальной концентрации препарата — 0,5 мг/мл. Инвитровый тест с максимальной стимуляцией хемотаксиса нейтрофилов явился ориентиром для выбора лечебной дозы. После лечения целенаправленная двигательная активность нейтрофилов возросла в 1,58 раза, а моноцитов — в 2,6 раза по сравнению с исходным уровнем. Послеоперационный период протекал благополучно. Ребенок выписан на 24 сутки.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для стимуляции угнетенной целенаправленной миграции фагоцитов, в условиях травматической болезни у детей целесообразно было применять малые дозы метилурацила. Большие же дозы препарата могут оказывать отрицательное влияние на локомоторную функцию нейтрофилов и моноцитов, либо не вызывать эффекта. Оценка хемотаксиса фагоцитов периферической крови к стандартному хемоаттрактанту С5а под воздействием различных концентраций метилурацила *in vitro* у детей с травматической болезнью позволила, используя предложенную формулу, довольно точно подобрать индивидуальную дозу данного препарата, которая обладала выраженным кинетикостимулирующим эффектом *in vitro*. Благодаря такому подходу в применении метилурацила удалось не только максимально восстановить угнетенную направленную двигательную реакцию фагоцитов, но и обеспечить благоприятное течение послеоперационного периода у всех 30 (100%) детей данной группы. При этом мы не наблюдали развития гнойно-воспалительных осложнений, несмотря на наличие у двух пациентов открытых переломов трубчатых костей.

ТАБЛИЦА 4. ИНДЕКС ХЕМОТАКСИСА НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ К C5a-КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НУКЛЕИНАТА НАТРИЯ *IN VITRO* ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (n = 15)

Больные	Индекс хемотаксиса нейтрофилов к C5a (усл. ед.) под действием различных концентраций нуклеината натрия				Индекс хемотаксиса нейтрофилов к C5a до коррекции (усл. ед.)	Индекс хемотаксиса нейтрофилов к C5a после коррекции (усл. ед.)
	Концентрация нуклеината натрия, мг/мл					
	0,3	0,23	0,15	0,03		
A	1,133	1,167	1,500	1,765	0,575	2,605
B	1,750	1,647	0,869	1,889	1,173	2,604
C	2,667	1,081	1,750	4,286	1,500	4,286
D	1,964	0,852	1,478	2,667	1,111	3,000
E	0,714	1,100	1,987	2,000	1,733	2,700
F	1,290	1,500	0,600	1,600	1,111	2,650
G	1,333	0,743	2,667	2,800	1,750	2,547
H	2,127	0,923	0,923	2,655	1,400	3,429
I	1,100	1,200	1,286	1,818	1,333	2,000
J	1,250	0,929	0,667	1,889	1,200	3,000
K	1,094	1,300	1,500	1,850	1,071	2,143
L	2,000	1,667	2,000	2,467	1,163	4,000
M	1,500	1,429	1,429	2,500	1,250	2,500
N	0,833	2,000	1,923	2,125	1,190	1,923
O	1,000	1,600	1,538	2,211	1,333	3,125
Норма: 2.09±0.10						

Норма: 2,09±0,10

Исследование влияния нуклеината натрия на локомоторную функцию фагоцитов

При исследовании кинетикотропных эффектов нуклеината натрия были получены следующие результаты. У всех 15 пациентов, которые впоследствии получали НН, в остром периоде после травмы наблюдалось достоверное ($p < 0,001$) снижение исходного уровня хемотаксиса нейтрофилов к стандартному хемоаттрактанту (C5a-компоненту комплемента) в 1,75 раза, а моноцитов — в 2,02 раза в сравнении со здоровыми детьми. Добавление к взвеси нейтрофилов НН у всех пациентов вызывало усиление хемотаксического ответа этих клеток к C5a, уровень которого зависел от концентрации препарата (табл. 4, 5). Как и метилурацил, НН оказывал максимальный стимулирующий эффект на угнетенную двигательную функцию нейтрофилов в минимальной концентрации — 0,03 мг/мл. У 6 из 15 пациентов хемотаксическую активность нейтрофилов стимулировали и более высокие концентрации препарата. Однако ее уровень не достигал показателей целенаправленной миграции, индуцированной минимальной дозой препарата. Максимальные концентрации НН либо не оказывали действия на локомоторную функцию нейтрофилов, либо еще в большей степени ее угнетали.

Действие различных концентраций НН на моноциты в определенной степени совпадало с их влиянием на нейтрофилы. Низкая концентрация препарата (0,03 мг/мл) также максимально стимулировала угнетенный хемотаксис моноцитов у большинства детей (11 пациентов). В 3 случаях двигательная активность клеток усиливалась и более высокими концентрациями НН. При этом усиление хемотаксиса было менее выражено, чем при добавлении минимальной дозы препарата. Концентрация НН 0,15 мг/мл вызывала выраженную стимуляцию только у 3 (20%) детей, а 0,3 мг/мл — лишь в 1 случае.

Нормализацию хемотаксиса фагоцитов периферической крови под действием той или иной концентрации нуклеината натрия *in vitro* мы расценивали как критерий эффективности данного препарата в указанной дозе. Поэтому

ТАБЛИЦА 5. ИНДЕКС ХЕМОТАКСИСА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ К С5а-КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НУКЛЕИНАТА НАТРИЯ *IN VITRO* ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (n = 15)

Больные	Индекс хемотаксиса моноцитов к С5а (усл. ед.) под действием различных концентраций нуклеината натрия				Индекс хемотаксиса моноцитов к С5а до коррекции (усл. ед.)	Индекс хемотаксиса моноцитов к С5а после коррекции (усл. ед.)
	Концентрация нуклеината натрия, мг/мл					
	0,3	0,23	0,15	0,03		
A	0,800	1,375	1,111	1,429	1,429	2,500
B	1,000	1,333	1,286	1,500	1,333	2,493
C	1,500	2,000	1,100	2,143	1,400	2,500
D	1,667	0,889	2,000	1,667	0,600	2,000
E	1,571	1,000	2,000	1,400	0,667	2,500
F	1,000	0,778	1,000	1,286	1,250	1,667
G	1,571	1,250	1,667	2,333	1,333	2,333
H	2,800	1,000	1,000	3,000	0,800	3,000
I	1,300	1,000	1,200	1,429	0,800	5,000
J	1,000	1,000	1,500	1,600	1,000	3,000
K	1,200	1,200	1,429	2,400	1,167	2,500
L	1,429	1,500	1,667	1,250	1,111	2,000
M	0,800	2,400	1,200	1,667	1,250	2,500
N	1,429	1,400	1,333	2,000	1,000	1,875
O	1,429	1,667	1,667	3,333	1,250	3,333
Норма: 2,20±0,1						

Норма: 2,20±0,1

в выборе лечебной дозы НН мы ориентировались на максимальный уровень активации хемотаксической функции нейтрофилов *in vitro*, который создавался, как правило, низкими концентрациями НН.

Индивидуальные лечебные дозы нуклеината натрия мы также рассчитывали по формуле, представленной выше. Больные получали препарат *per os*, трехкратно в течение 10 дней, после чего проводилось повторное исследование локомоторной функции фагоцитов.

При оценке результатов применения индивидуально подобранных доз НН в 93,33% случаев отмечено совпадение действия препарата *in vitro* и *in vivo* как на модели нейтрофилов, так и на модели моноцитов.

В качестве иллюстрации использования оценки хемотаксической реакции иммунокомпетентных клеток к различным концентрациям нуклеината натрия для прогноза его максимальной эффективности и индивидуального подбора приводим следующий клинический пример.

Больной Н, 8 лет, поступил в отделение детской ортопедии травматологии Челябинской областной клинической больницы на вторые сутки после получения травмы с диагнозом: закрытый, полный аддукционный перелом в/3 левой плечевой кости. При поступлении наложено скелетное вытяжение за н/3 левого плеча. В послеоперационном периоде проведено клинко-иммунологическое обследование. У пациента выявлено угнетении направленной миграции нейтрофилов в 1,56 раза, а моноцитов – в 2,75 раза, относительно нормальных показателей.

После проведения предварительного тестирования НН *in vitro* с нейтрофилами и моноцитами больного максимальная стимуляция хемотаксиса данных клеток отмечена под воздействием минимальной концентрации препарата – 0,03 мг/мл. Инвитровый тест с наиболее выраженной стимуляцией хемотаксической реакции нейтрофилов явился ориентиром для выбора лечебной дозы. После лечения НН целенаправленная двигательная активность нейтрофилов нормализовалась и

возросла в 2,45 раза, моноцитов — в 3,75 раза относительно исходного уровня. Послеоперационный период протекал благополучно. Ребенок выписан из стационара на 25 сутки.

Приведенные результаты исследования подтверждают, что для восстановления угнетенной целенаправленной подвижности фагоцитов более целесообразно применять небольшие дозы нуклеината натрия, так как более высокие концентрации препарата могут быть не эффективны, либо отрицательно влиять на угнетенную кинетическую функцию фагоцитов. Оценка хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов периферической крови к С5а под действием различных концентраций нуклеината натрия *in vitro* у детей с травматической болезнью позволяет по предложенной формуле довольно точно определить наиболее адекватную его дозу для коррекции двигательных нарушений данных клеток. Применение нуклеината натрия с предварительным индивидуальным подбором дозы способствует не только коррекции двигательных нарушений фагоцитов, но и более гладкому течению послеоперационного периода. У всех 15 (100%) детей данной группы мы не наблюдали развития гнойно-воспалительных осложнений, даже несмотря на то, что исходные показатели хемотаксиса нейтрофилов у 8 детей и моноцитов у 11 пациентов были ниже его уровня в группе ранее обследованных детей с осложненным течением травматической болезни. Из этого можно предположить, что применение нуклеината натрия в индивидуально подобранных дозах способствовало снижению риска развития гнойно-воспалительных осложнений травмы.

Исследование влияния АТФ на кинетическую функцию фагоцитов

У всех 25 пациентов с механической травмой, у которых в последующем был применен АТФ, в остром периоде выявлено достоверное ($p < 0,001$) снижение направленной миграции нейтрофилов в 1,58 раза, а моноцитов — в 2,32 раза. Добавление к взвеси нейтрофилов и моноцитов различных концентраций АТФ приводило к неоднозначному изменению хемотаксического ответа клеток к С5а (таблицы 6, 7). Концентрация препарата 0,1 мг/мл вызывала максимальную стимуляцию угнетенной кинетической функции нейтрофилов в 24 случаях. Из них у 12 пациентов хемотаксическая активность усиливалась и под влиянием следующей более высокой концентрации, не достигая при этом величины показателей хемотаксиса, индуцированного минимальной дозой препарата. Высокие же концентрации АТФ не имели эф-

фекта на локомоторную функцию данных клеток или еще больше угнетали ее. У 2 пациентов мы отмечали одинаково выраженную стимуляцию хемотаксиса нейтрофилов на две концентрации препарата. В этом случае при расчете лечебной дозы предпочтение отдавалось минимальной концентрации препарата.

Максимальная стимуляция хемотаксической активности моноцитов была также отмечена у 22 пациентов этой группы при добавлении к взвеси клеток АТФ в концентрации 0,1 мг/мл. У 12 из них повышение целенаправленной миграции индуцировала и следующая более высокая концентрация препарата. При этом усиление хемотаксиса было менее выражено, чем при применении минимальной дозы АТФ. Концентрация препарата 0,5 мг/мл вызывала значимую стимуляцию хемотаксиса моноцитов только у 3 больных, а более высокие дозы и того реже — в 1 случае.

В выборе дозы для лечения больных мы ориентировались, как и в случае с М и НН, на максимальный уровень инвитровой стимуляции хемотаксической функции нейтрофилов. В основном, это были низкие концентрации препарата (в 96% случаев). Согласно приведенной выше формуле, мы определяли индивидуальные дозы АТФ для лечения пациентов и назначали их в/мышечно, однократно в течение 10 дней. После этого у больных повторно исследовалась двигательная функция фагоцитов.

При оценке результатов применения индивидуально подобранных доз АТФ в 96% случаев было отмечено совпадение эффекта препарата *in vitro* и *in vivo* на модели нейтрофилов, и в 92% — на модели моноцитов.

В качестве иллюстрации хемокинетикотропных свойств АТФ и результатов подбора его индивидуальной дозы приводим следующий клинический пример.

Больной А, 10 лет, поступил в отделение ортопедии и травматологии Челябинской клинической больницы в первые 24 часа после получения травмы с диагнозом: закрытый перелом правого бедра на границе средней и в/3 со смещением костных отломков по ширине и под углом. В экстренном порядке проведена спица Киршнера за надмышечковую область правого бедра, наложена скоба ЦИТО для скелетного вытяжения грузом в 4 кг. Иммунологическое обследование выявило снижение хемотаксической активности нейтрофилов в 1,61 раза, а моноцитов — в 1,89 раза. При проведении лабораторного тестирования АТФ с клетками больного *in vitro* наиболее значимая стимуляция направленной миграции нейтрофилов и моноцитов от-

ТАБЛИЦА 6. ИНДЕКС ХЕМОТАКСИСА НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ К С5а-КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АТФ *IN VITRO* ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (n = 25)

Больные	Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а (усл. ед.) под действием различных концентраций АТФ				Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а до коррекции (усл. ед.)	Индекс хемотаксиса нейтрофилов к С5а после коррекции (усл. ед.)
	Концентрация АТФ, мг/мл					
	1,0	0,75	0,5	0,1		
A	1,000	1,222	0,952	2,267	1,364	5,000
B	1,714	1,000	1,200	2,400	0,850	3,050
C	1,500	1,333	1,538	2,500	1,200	2,512
D	0,950	1,250	2,500	2,500	1,250	2,833
E	1,667	1,167	1,667	2,667	1,000	3,000
F	1,857	2,000	1,857	2,000	0,900	2,500
G	2,500	1,500	2,167	3,000	1,406	3,000
H	2,000	1,500	1,600	3,000	1,429	4,000
I	1,500	1,500	1,250	2,300	1,154	3,000
J	2,000	1,111	2,222	4,000	1,917	4,000
K	3,250	1,500	1,143	3,500	1,111	3,500
L	2,333	2,308	2,000	3,750	1,400	3,750
M	3,000	1,714	1,389	3,750	1,167	4,000
N	1,500	1,000	0,714	2,500	1,625	3,000
O	2,667	1,250	0,800	3,500	1,235	4,375
P	1,500	1,438	2,000	2,500	1,056	3,333
Q	2,667	2,500	1,500	3,500	1,600	3,500
R	2,667	1,000	1,500	3,000	1,750	3,333
S	1,333	1,444	1,714	3,200	1,957	3,571
T	2,500	1,667	1,917	2,917	1,250	3,000
U	2,500	1,764	2,000	2,667	1,267	2,500
V	1,667	0,833	1,176	3,000	1,300	4,000
W	1,250	2,000	2,400	2,000	1,200	3,333
X	0,923	1,800	2,250	2,320	1,375	2,322
Y	2,182	2,107	1,929	3,400	1,563	5,714
				Норма: 2,09±0,10		

ТАБЛИЦА 7. ИНДЕКС ХЕМОТАКСИСА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМОЙ К C5a-КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АТФ *IN VITRO* ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (n = 25)

Больные	Индекс хемотаксиса моноцитов к C5a (усл. ед.) под действием различных концентраций АТФ				Индекс хемотаксиса моноцитов к C5a до коррекции (усл. ед.)	Индекс хемотаксиса моноцитов к C5a после коррекции (усл. ед.)
	Концентрация АТФ, мг/мл					
	1,0	0,75	0,5	0,1		
A	0,857	1,250	1,429	2,000	1,167	2,500
B	1,000	2,143	4,000	2,000	0,700	4,000
C	0,714	0,700	1,500	1,667	1,000	2,251
D	0,700	1,750	1,875	2,000	0,800	2,000
E	1,429	1,000	1,125	2,400	0,500	2,400
F	1,429	1,667	1,400	2,000	1,000	2,143
G	1,429	1,000	1,000	2,000	0,833	2,000
H	1,200	2,500	1,200	3,000	0,857	3,000
I	1,333	1,667	1,500	2,000	1,200	2,000
J	2,000	1,000	1,800	2,000	1,429	2,000
K	1,429	1,000	1,000	2,000	1,250	2,000
L	1,250	1,000	1,143	2,152	0,667	2,152
M	2,000	2,000	1,667	2,500	1,000	3,333
N	1,667	1,250	1,000	2,000	1,400	2,600
O	1,667	1,000	2,000	3,000	1,167	3,000
P	1,429	1,000	1,444	1,714	1,000	2,000
Q	1,000	1,429	2,500	3,000	1,000	3,000
R	2,500	1,500	1,000	2,750	0,667	3,333
S	1,182	1,154	1,500	1,611	1,154	3,000
T	1,250	0,857	1,750	2,167	0,750	3,000
U	2,000	1,500	2,250	2,000	0,875	3,000
V	1,600	1,750	1,250	2,286	1,000	3,000
W	0,769	1,250	2,400	2,000	0,500	2,251
X	2,400	1,667	2,250	3,250	1,125	2,400
Y	1,167	1,800	1,714	2,000	0,800	2,333
				Норма: 2,20±0,1		

мечена под действием минимальной концентрации препарата — 0,1 мг/мл. В выборе лечебной дозы мы учитывали концентрацию препарата, вызывавшую максимальную стимуляцию хемотаксиса нейтрофилов *in vitro*. После лечения целенаправленная двигательная активность нейтрофилов увеличилась в 3,67 раза, а моноцитов — в 2,14 раза по сравнению с исходным уровнем. Послеоперационный период протекал гладко. Ребенок выписан на 30 суток.

Заключение

В результате проведенных исследований нами установлено, что все изучаемые препараты обладают выраженным стимулирующим влиянием на угнетенную целенаправленную миграцию фагоцитов у детей с травмой. При этом их максимальный эффект *in vitro* отмечен при применении малых концентраций препаратов. Индекс хемотаксиса нейтрофилов детей с травмой под влиянием малых доз метилурацила, нуклеината натрия и АТФ соответственно возрастал *in vitro* в среднем в 1,69, 1,84 и 2,15 раза.

Большие дозы препаратов, как правило, оказывали отрицательное влияние на локомоторную функцию нейтрофилов и моноцитов либо не вызывали эффекта.

Таким образом, разработанная схема индивидуального подбора дозы лекарственных препаратов позволяет не только своевременно начинать коррекцию имеющихся нарушений двигательной функции фагоцитов, но и получить положительный хемотаксикотропный эффект и улучшить результаты лечения детей с травматической болезнью.

Список литературы

1. Баиров Г.А. Детская травматология. — СПб.: Питер, 2000. — 384 с.
2. Беляков И.М., Земсков В.М. Изменение функциональной активности макрофагов при ожогах и ее коррекция нуклеинатом натрия // Иммунология. — 1992. — № 5. — С. 33-35.
3. Глоба А.Г., Зайцева В.Г., Тепляков В.Г. Обращение плазмомембранного сигнального АТФ активированными нейтрофилами и макрофагами: связь с продукцией супероксида и состоянием рецепторов к формилпептидам / А.Г. Глоба, // Вопр. мед. химии. — 1992. — Т. 38, № 3. — С. 13-17.
4. Долгушин И.И., Эберт Л.Я., Лифшиц Р.И. Иммунология травмы. — Свердловск, 1989. — 221 с.
5. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. — Екатеринбург: УрО РАН, 2001. — 279 с.
6. Земсков В.М. Неспецифические иммуностимуляторы: сообщ. 1 // Успехи современ. биологии. — 1991. — Т. 111, Вып. 3. — С. 444-459.
7. Злакоманова О.Н. Нарушения локомоторных функций фагоцитов у детей с травматической болезнью и подбор индивидуальной дозы препаратов для их коррекции: дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2002. — 201 с.
8. Зурочка А.В. Иммунобиологические свойства секреторных продуктов нейтрофилов (нейтрофилокинов): дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1991. — 231 с.
9. Калинина Н.М., Сосюкин А.Е., Воложанин Д.А. Травма: воспаление и иммунитет // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 28-35.
10. Каримова Ф.Г. цАМФ-мессенджерная система клеток растений и ее роль в регуляции транспорта воды и Ca^{2+} : автореф. дис. ...д-ра биол. наук. — СПб., 1994. — 39 с.
11. Клиническая иммунология: руководство для врачей / под ред. Е.И. Соколова — М.: Медицина, 1998. — 272 с.
12. Кузнечихин Е.А., Немсадзе В.П. Множественная и сочетанная травма опорно-двигательной системы у детей. — М.: Медицина, 1999. — 336 с.
13. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1989. — 344 с.
14. Слабнов Ю.Д., Черепнев Г.В., Каримова Ф.Г. Влияние пиримидиновых производных на аденилатциклазную систему регуляции иммунореспонсивности клеток *in vitro* // Бюл. эксперим. Биологии и медицины. — 1998. — № 6. — С. 663-665.
15. Студеникина Ю.Н. Значение исследования локомоторной функции нейтрофилов в определении вида возбудителя: дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 2000. — 215 с.
16. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. — СПб.: Наука, 2000. — Т. 1-2. — 231 с.
17. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о защите организма от инфекции // Иммунология. — 2000. — № 1. — С. 61-64.
18. Чукичев А.В. Исследование факторов неспецифической защиты и иммунной системы у детей с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями с целью индивидуального подбора иммунокорректирующих препаратов: дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 1984. — 276 с.
19. Ярцев М.Н., Комель Г.И., Гомес Л.А. Контролируемые рандомизированные клинические испытания иммуномодуляторов диуцифона

и нуклеината натрия у детей с рецидивирующими гнойными инфекциями // Педиатрия . — 1991. — № 3. — С. 55-59.

20. Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L. Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes // J. Immunol. — 1975. — Vol. 115. — N 6. — P. 1650-1656.

21. Wong, L., Wilson R.D. The identification of Fc and C3 receptors on human neutrophils // J. Immunol. Meth. — 1975. — Vol. 7. — P. 69-76.

поступила в редакцию 20.05.2006

отправлена на доработку 30.06.2006

принята к печати 25.12.2006