

АДСОРБЦИЯ ЦИТОКИНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННОГО УГЛЕРОДНОГО СОРБЕНТА *IN VITRO* ПРИ ПЕРИТОНИТЕ

Т. И. Долгих¹, Л. Г. Пьянова², О. Н. Бакланова², В. Т. Долгих¹, Л. С. Лузянина²,
С. И. Филиппов³, Т. Ф. Соколова¹, А. Н. Саланов⁴, А. В. Глущенко³,
А. В. Ершов¹, Б. А. Рейс¹, В. А. Лихолобов²

¹ Омская государственная медицинская академия, Омск

² Институт проблем переработки углеводородов СО РАН

³ Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №1, Омск

⁴ Институт катализа СО РАН, Новосибирск

Cytokine Adsorption onto the Modified Carbon Sorbent Surface *in vitro* in Peritonitis

T. I. Dolgikh¹, L. G. Pyanova², O. N. Baklanova², V. T. Dolgikh¹, L. S. Luzyanova²,
S. I. Filippov³, T. F. Sokolova¹, A. N. Salanov⁴, A. V. Glushchenko³,
A. V. Yershov¹, B. A. Reis¹, V. A. Likholobov²

¹ Omsk State Medical Academy, Omsk;

² Institute of Hydrocarbon Process Problems, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences;

³ City Clinical Emergency Medical Care Hospital One, Omsk

⁴ Institute of Catalysis, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Цель исследования – оценить эффективность сорбции цитокинов из плазмы крови больных разлитым гнойным перитонитом углеродным сорбентом с локально модифицированной аминокaproновой кислотой поверхностью. **Материал и методы.** Материалом для исследования служила плазма крови, полученная при проведении плазмафереза у 10 больных острым панкреатитом, осложнившимся панкреонекрозом и разлитым гнойным перитонитом, в которой до сорбции и после сорбции определяли содержание цитокинов: интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-4 (IL-4) и интерлейкина-8 (IL-8) методом иммуноферментного анализа. Проведена сравнительная оценка сорбционных свойств углеродного гемосорбента и сорбента, модифицированного аминокaproновой кислотой. **Результаты.** Модифицирование поверхности углеродного адсорбента аминокaproновой кислотой с последующей ее поликонденсацией приводит к увеличению содержания поверхностных функциональных групп (кислород- и азотсодержащих), усиливающих гидрофильность поверхности и специфический характер сорбции, что позволяет значительно повысить эффективность сорбции ряда цитокинов различной гидрофобности, тем самым выступать в качестве средства контроля и управления концентрацией в плазме крови регуляторных белков, прежде всего провоспалительного цитокина IL-1 β , хемокина IL-8 и цитокина Т-хелперного клона – IL-4. **Ключевые слова:** перитонит, цитокины, углеродный сорбент.

Objective: to evaluate the efficiency of cytokine sorption with carbon with a locally aminocaproic acid-modified surface from the plasma of patients with general purulent peritonitis. **Materials and methods.** The material of the investigation was the plasma obtained during plasmapheresis in 10 patients with acute pancreatitis complicated by pancreonecrosis and general purulent peritonitis, which was used to estimate before and after sorption the content of the cytokines: interleukin (IL)-1 β , IL-4, and IL-8 by enzyme immunoassay. The sorption properties of carbon hemosorbent and aminocaproic acid-modified sorbent were comparatively evaluated. **Results.** Aminocaproic acid-induced modification of the carbon adsorbent surface with its further polycondensation results in the higher content of superficial functional groups (oxygen- and nitrogen-containing) that enhance the hydrophilicity of the surface and the specific pattern of sorption, thus acting as a means for controlling and regulating the plasma concentration of regulatory proteins, primarily the proinflammatory cytokine IL-1 β , the chemokine IL-8 and the T-helper cell clone cytokine IL-4. **Key words:** peritonitis, cytokines, carbon sorbent.

Распространенный перитонит, как осложнение острых хирургических заболеваний, нередко приводит к генерализации процесса, развитию септического шока, по-

лиорганной недостаточности и высокой летальности [1–4]. В последнее десятилетие были проведены углубленные клинко-экспериментальные исследования по разработке патогенетических методов регуляции и коррекции иммунологических нарушений в органах и системах организма при перитоните [5, 6]. К способам регулирования можно отнести постепенное изменение в спектре регуляторных пептидов биологической активности цитокинов,

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Долгих Владимир Терентьевич
E-mail: prof_dolgih@mail.ru

обладающих регулируемыми эффектами [7–9]. Цитокины в низких концентрациях нужны для правильного формирования местного воспаления, более высокие концентрации вызывают развитие системной воспалительной реакции. Содержание цитокинов существенно повышается при эндотоксикозе [10]. Избыток цитокинов ведет к снижению, а затем и подавлению чувствительности собственной системы детоксикации организма больного и определяет извращенный ответ на медикаментозную терапию при этих состояниях [11]. Именно со снижением количества цитокинов ниже критического уровня связывают так называемый «деблокирующий эффект» методов экстракорпоральной гемокоррекции, в том числе и гемосорбции, на систему детоксикации организма [12]. В медицинской практике для снижения концентрации и удаления из организма соединений различной природы нашли применение сорбционные материалы, особенно углеродные адсорбенты, полученные на основе разного вида сырья: минерального, синтетического, природного происхождения [13]. Поверхность углеродных сорбентов гидрофобна по своей природе, что очень важно при сорбции белковых веществ. Начальными процессами неспецифической сорбции белков являются именно гидрофобные взаимодействия между поверхностью сорбента и гидрофобными участками белка [14].

Однако невысокое качество большинства углеродных сорбентов затрудняет, а иногда делает практически невозможным их применение для сорбции белковых соединений. Гранулы сорбентов способны разрушаться с выделением углеродной пыли в биологическую жидкость при контакте с нею (угли СКТ-6А ВЧ, ИГИ, БАУ и др.), кроме того, микропористая структура таких сорбентов как ФАС и СКН малодоступна для крупных молекул белка [15, 16]. Специфическое взаимодействие углеродных материалов с белковыми молекулами незначительно. Это связано с присущей им особенностью — невысоким содержанием поверхностных функциональных групп, в основном кислородсодержащих, являющихся активными центрами адсорбции и усиливающих гидрофильный характер поверхности.

Разработанный Институтом проблем переработки углеводородов СО РАН и известный высоким качеством мезопористый углеродный гемосорбент ВНИИТУ-1 способен адсорбировать белковые соединения определенной молекулярной массы, но также в недостаточном количестве [17]. Указанный недостаток гемосорбента снижает эффективность его применения, как и других углеродных сорбентов, при лечении заболеваний, связанных с накоплением регуляторных белков. Основным направлением повышения активности углеродных сорбентов по отношению к белковым соединениям является модифицирование их поверхности [18]. Способы модифицирования, позволяющие регулировать текстуру и химическую природу поверхности сорбентов, а значит, усиливающие селективный характер сорбции веществ, довольно разнообразны.

Цель настоящего исследования — оценить эффективность сорбции цитокинов из плазмы крови больных разлитым гнойным перитонитом углеродным сорбен-

том с локально модифицированной аминакапроновой кислотой поверхностью.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила плазма крови, полученная при проведении плазмафереза у 10-и больных острым панкреатитом, осложнившимся панкреонекрозом и разлитым гнойным перитонитом. Больные находились на лечении в отделении гравитационной хирургии Городской клинической больницы скорой медицинской помощи №1. Средний возраст составлял $37 \pm 2,1$ лет. Перфузию плазмы проводили с помощью аппарата «Унирол-1» через колонки объемом 10 см³, заполненные сорбентом, со скоростью 15 мл/мин при соотношении «плазма/сорбент» 10:1. В целом через колонку пропускалось 50 мл плазмы. В плазме крови до сорбции и после сорбции определяли содержание цитокинов: интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-4 (IL-4) и интерлейкина-8 (IL-8), являющегося хемокином, методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. Учет результатов проводился на планшетном спектрофотометре «Multiskan» (Финляндия).

Материалом для исследований выбран гемосорбент углеродный, отличающийся от гемосорбента углеродного ВНИИТУ-1 более высоким суммарным объемом пор, удельной площадью поверхности. Гемосорбент углеродный на основе нанодисперсного углерода произведен по технологической схеме получения гемосорбента углеродного ВНИИТУ-1 [17].

В качестве модификатора использована аминакапроновая кислота (химическая формула H₂N-(CH₂)₅-COOH, молекулярная масса 131,2). Выбор модификатора обусловлен нетоксичностью кислоты, присутствием в ее составе двух разных по природе функциональных групп гидрофильного характера (-COOH- и NH₂-), разделенных гидрофобной цепью из групп -(CH₂)₅-. Однотипные функциональные группы существуют и в молекулах белков.

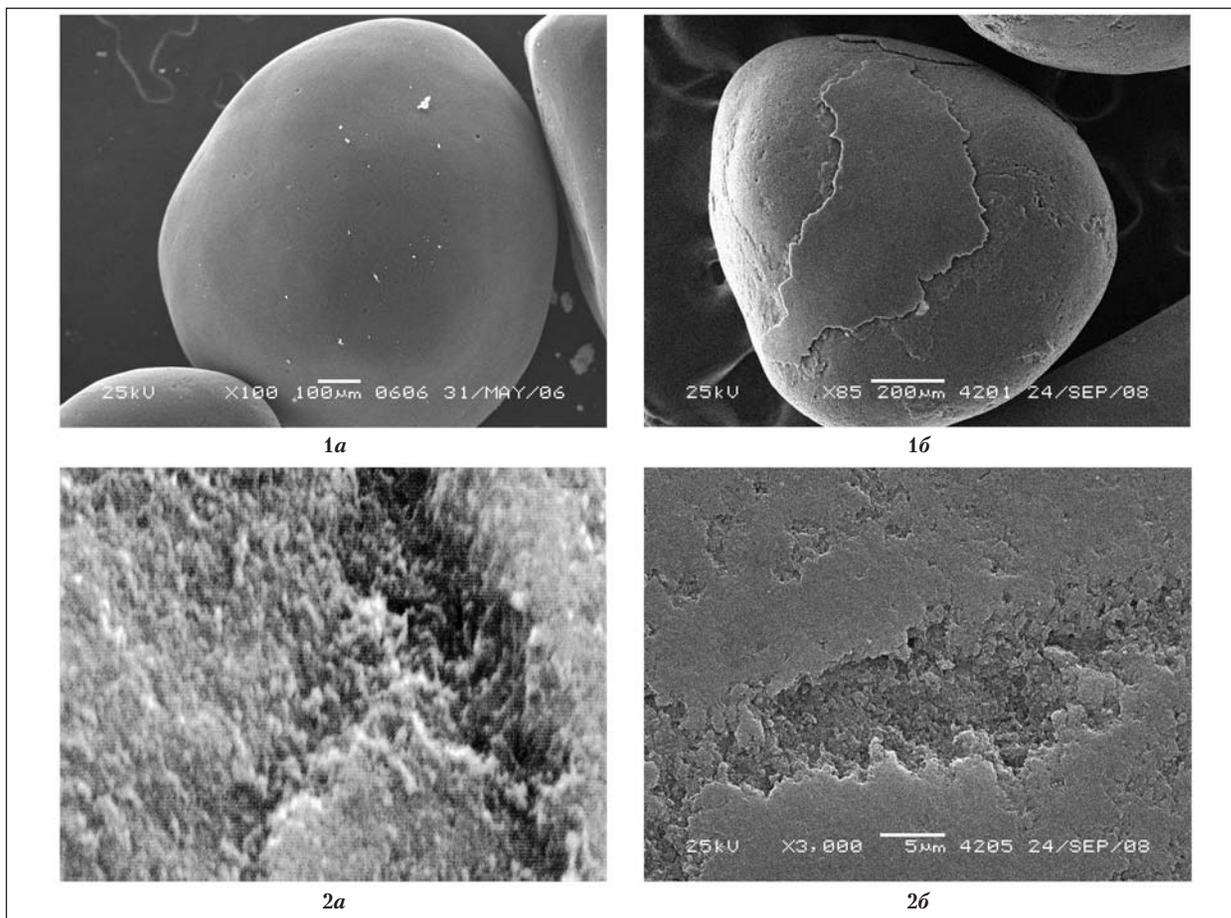
Текстура поверхности образцов углеродного сорбента (исходного и модифицированного) исследована адсорбционным методом по адсорбции-десорбции стандартного газа — азота — на объемной вакуумной автоматизированной статической установке «Sorptomatic-1900». По данным изотерм адсорбции-десорбции азота в области относительных давлений $P/P_0 = 10^{-4} \pm 1$ рассчитана удельная адсорбционная поверхность, суммарный объем пор, объем микропор, мезопор и макропор, распределение объема пор по размерам и средний размер пор. Общее количество кислых кислородсодержащих групп, содержание карбоксильных, фенольных, лактонных групп определено химическим методом (метод Бозма), потенциометрического титрования, содержание азота — методом Кьельдаля.

Рельеф и морфология поверхности образцов углеродного сорбента определены сканирующей электронной микроскопией (электронный микроскоп JSM - 6460 LV (JEOL), Япония).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0. Применяли методы непараметрической статистики. Для сравнения числовых данных двух связанных групп использовали критерий Вилкоксона, числовых данных двух независимых групп — *U*-критерий Манна-Уитни. Значения количественных признаков приведены в виде медианы (*Me*), средних квартильных отклонений (*Q*): 25-перцентиль и 75-перцентиль. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости *p* принимался, равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Проведено модифицирование поверхности углеродного гемосорбента ВНИИТУ-1 аминакапроновой кислотой путем пропитки сорбента ее раствором с последующей



Электроннограммы гранул (1а и 1б) и поверхности углеродного сорбента (2а и 2б).

1а – гранула углеродного сорбента ВНИИТУ (ув. ×100); 1б – модифицированного углеродного сорбента (ув. ×85); 2а – поверхность гранулы углеродного сорбента (ув. ×3000); 2б – поверхность гранулы модифицированного углеродного сорбента (ув. ×3000).

поликонденсацией при определенных условиях. Условия модифицирования выбраны с целью достижения локального закрепления модификатора на поверхности гранул углеродного сорбента в виде отдельных участков («островков») подтверждают электронно-микроскопические снимки (рис. 1). Характер локального закрепления модификатора на поверхности гранул углеродного сорбента в виде отдельных участков («островков») подтверждают электронно-микроскопические снимки (рис. 1).

Закрепленный на поверхности модификатор «выравнивает» ее рельеф, делает более гладким (рис. 1, б). Изменение рельефа поверхности гранул сорбента приводит к изменению его текстурных характеристик (табл. 1).

Согласно приведенным данным, модифицирование поверхности сорбента даже при локальном закреплении

модификатора сопровождается значительным снижением величины удельной адсорбционной поверхности ($S_{БЭТ}$), общего объема пор, перераспределением его по размеру пор – снижением объема мезопор и увеличением объема макропор. По данным исследования в структуре модифицированного образца отсутствуют микропоры, очевидно «закрытые» модификатором (диаметр молекулы аминокaproновой кислоты 0,6–0,7 нм). Изменения в структуре сорбента привели к увеличению расчетного диаметра пор с 9,0 нм до 15,4 нм. Однако «островковый» характер закрепления модификатора на поверхности углеродного сорбента сохраняет определенную часть исходной структуры.

Модифицирование поверхности сорбента аминокaproновой кислотой с последующей поликонденсацией приводит к изменению ее функционального покрова:

Таблица 1

Текстура и содержание функциональных групп на поверхности исходного (1) и модифицированного (1М) образцов гемосорбента

№ образца	Объем пор, см ³ /г				$S_{БЭТ}$, м ² /г	Расчетный диаметр пор, нм	Содержание кислородных групп, м-экв/г				Содержание азота, %
	микро-	мезо-	макро-	общий			общее количество	карбоксильных	лактоновых	фенольных	
1	0,022	0,858	0,079	0,959	425	9,0	0,086	0,024	0,034	0,028	нет
1М	–	0,444	0,091	0,535	139	15,4	0,196	0,110	0,005	0,081	0,40

Таблица 2

Изменение концентрации цитокинов в плазме крови больных панкреатитом после контакта с углеродными сорбентами ($Me \pm Q$)

Цитокин	Исходное значение	Сорбент ВНИИТУ-1	Модифицированный сорбент	Заряд молекулы при pH 7,4
IL-1 β	13,6 \pm 0,4	13,4 \pm 1,9 1,4%	0 \pm 0,1* 100%	-12,87 pI=4,29
IL-4	15,1 \pm 0,9	6,5 \pm 0,7* 59,6%	1,2 \pm 0,1* 92,1%	7,2 pI=10,00
IL-8	6,9 \pm 1,2	3,8 \pm 1,0 44,9%	2,6 \pm 0,8* 62,3%	4,06 pI=9,9

Примечание. Me — медиана; Q — среднее квартильное отклонение. $Q=1/2 ((Q1-Me)+(Me-Q2))$, где Q1 — верхний квартиль, Q2 — нижний квартиль. * — различия статистически значимы по сравнению с исходными показателями ($p < 0,05$).

практически в 2 раза увеличена концентрация кислородсодержащих групп кислого характера, в основном, за счет повышения количества наиболее реакционноспособных карбоксильных и фенольных групп (в 3–5 раз) и снижения лактонных групп.

Закрепление содержащего NH₂-группы модификатора на поверхности приводит к появлению на ней азота в виде азотсодержащих групп (0,4%).

В Центральной научно-исследовательской лаборатории Омской государственной медицинской академии проведены стендовые исследования влияния модификации поверхности углеродного сорбента на его адсорбционные свойства по отношению к цитокинам определенной природы: интерлейкинам IL-1 β , IL-4 и IL-8. Изоэлектрическая точка цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-8 pI 4,29; 10,00 и 9,90, соответственно, поэтому при pH 7,4 (средняя величина pH крови) их молекулы гидрофильны, величина заряда составляет -12,87, 7,2 и 4,06, соответственно (табл. 2). Результаты испытаний, отражающие изменение адсорбционной активности углеродного сорбента по отношению к белкам после модифицирования, представлены в табл. 2.

Стендовые испытания позволяют говорить о повышенной (в сравнении с исходным) адсорбционной активности модифицированного аминокaproновой кислотой углеродного адсорбента по отношению к регуляторным белкам-цитокинам.

Данный эффект обусловлен повышением сорбции цитокинов за счет усиления специфического взаимодействия (электростатического, донорно-акцепторного, химического и др.) с активными центрами поверхности сорбента, роль которых выполняют реакционноспособные кислородсодержащие и азотсодержащие группы. При этом, как установлено испытаниями, специфическое взаимодействие поверхности сорбента с цитокином усиливается с повышением заряда молекулы по абсолютной величине. Практически полностью адсорбиру-

ются, несмотря на знак заряда — положительный или отрицательный, интерлейкины IL-1 β и IL-4, что можно объяснить их взаимодействием с разными по характеру функциональными группами.

Специфический характер сорбции цитокинов, в отличие от неспецифической (молекулярной) сорбции, присущей углеродным сорбентам, в меньшей степени зависит от текстуры сорбента.

Расчетным путем установлены размеры исследуемых цитокинов: длина интерлейкинов IL-1 β и IL-4 составлена из 152 и 153 аминокислот, соответственно, их молекулярная масса 17386,5 Да и 17492,1 Да, тогда как длина интерлейкина IL-8 — из 79 аминокислот, молекулярная масса 9108, 5 Да. Меньший по размеру и массе интерлейкин IL-8 (хемокин) сорбируется хуже поверхностью модифицированного образца, чем более крупные интерлейкины IL-1 β и IL-4. Очевидно, что заряд данных цитокинов (-12,9 и 7,2) играет более значительную роль в сорбционном процессе (степень извлечения 100 и 92,64%), чем изменение текстуры сорбента — увеличение размера пор при снижении их общего объема.

Заключение

Таким образом, модифицирование поверхности углеродного адсорбента аминокaproновой кислотой с последующей ее поликонденсацией приводит с увеличению содержания поверхностных функциональных групп (кислород- и азотсодержащих), усиливающих гидрофильность поверхности и специфический характер сорбции. Данные изменения поверхности углеродного адсорбента позволяют значительно повысить эффективность сорбции ряда цитокинов различной гидрофобности, тем самым выступать в качестве средства контроля и управления концентрацией в плазме крови регуляторных белков, прежде всего провоспалительного цитокина IL-1 β , хемокина IL-8 и цитокина T-хелперного клона — IL-4.

Литература

1. Гостичев В., Сажин В. П., Авдоенко А. П. Перитонит. М.: Медицина; 2002.
2. Лазарев С. М., Гамзатов Х. А. Роль цитокинов в развитии и лечении перитонита. Вестн. хирургии 2008; 167 (5): 109–113.
3. Wirtz S., Tubbe I., Galle P. R. et al. Protection from lethal septic peritonitis by neutralizing the biological function of IL 27. J. Exp. Med. 2006; 203 (8): 1875–1881.
4. Neurath M. F. New therapies for sepsis: focus on the interleukin (IL) 12 family member IL27. Ann. Rheum. Dis. 2007; 66 (Suppl 3): iii29–iii31.
5. Козлов В. К. Иммунопатогенез и цитокиноterapia хирургического сепсиса. Вестн. Росс. Воен.-мед. академии 2002; 2: 12–22.
6. Weijer S., Sewnath M. E., de Vos A. F. et al. Interleukin-18 facilitates the early antimicrobial host response to *Escherichia coli* peritonitis. Infect. Immun. 2003; 71 (10): 5488–5497.
7. Хавинсон В. Х., Кветная Т. В. Регуляторные пептиды и гомеостаз. Росс. химич. журн. 2005; XLIX (1): 112–117.
8. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб.: ООО «Издательство Фолиант»; 2008. 552.

9. *Rodriguez-Gaspar M., Santolaria F., Jarque-Lopez A. et al.* Prognostic value of cytokines in sirs general medical patients. *Cytokine* 2001; 15 (4): 232–236.
10. *Spittler A., Razenberger M., Kupper H. et al.* Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis? Monocyte phenotype, monocyte phagocytic, and cytokine production. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 31 (6): 1338–1342.
11. *Gogos C. A., Drosou E., Bassaris H. P., Skoutelis A.* Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis; a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* 2000; 181 (1): 176–180.
12. *Stack A. M., Saladino R. A., Thompson C. et al.* Failure of prophylactic and therapeutic use of a routine anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody in *Escherichia coli* sepsis in the rabbit. *Crit. Care Med.* 1995; 23 (9): 1512–1518.
13. *Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н.* Гемосорбция. М.: Медицина; 1985.
14. Химия привитых поверхностных соединений. Лисичкин Г. В. (ред.). М.: ФИЗМАТЛИТ; 2003.
15. *Николаев В. Г., Стрелко В. В.* Гемосорбция на активированных углях. Киев: Наукова думка; 1979.
16. *Мухин В. М., Тарасов А. В., Клушин В. Н.* Активные угли России. М.: Металлургия; 2000.
17. *Суровикин В. Ф., Пьянова Л. Г., Лузянина Л. С.* Новые гемо- и энтеросорбенты на основе нанодисперсных углерод-углеродных материалов. *Росс. химич. журн.* 2007; LI (5): 159–165.
18. *Тихонова Л. С., Белоцерковский М. В., Дубикайтис А. Ю. и соавт.* Влияние поляризации активированного угля на адсорбцию мочевины, креатинина и альбумина. *Журн. прикладной химии* 1992; 65 (9): 2050–2052.

Поступила 16.07.09

ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ

Научно-практический журнал «Общая реаниматология», входящий в перечень ВАК РФ, предназначен для врачей анестезиологов-реаниматологов и научных сотрудников.

Тематика журнала: патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика и патологическая анатомия критических, терминальных и постреанимационных состояний. Вопросы оказания догоспитальной помощи при критических состояниях. Вопросы обучения населения и медицинского персонала приемам оказания неотложной помощи при критических состояниях.

Аудитория: лечебные учреждения; высшие учебные заведения медицинского профиля; медицинские учреждения последипломного образования, Федеральные и региональные органы управления здравоохранением, медицинские научно-исследовательские институты; медицинские библиотеки.

ПОДПИСКА

В любом почтовом отделении связи по каталогу «Роспечать»

- индекс 46338 — для индивидуальных подписчиков
- индекс 46339 — для предприятий и организаций

Диссертации на соискание ученой степени доктора наук, защищенные после 01 июля 2004 года без опубликования основных научных результатов в ведущих журналах и изданиях, перечень которых утвержден Высшей аттестационной комиссией, будут отклонены в связи с нарушением п. 11 Положения о порядке присуждения ученых степеней.

Перечень журналов ВАК, издаваемых в Российской Федерации по специальности 14.00.37 «Анестезиология и реаниматология», в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата медицинских наук:

- Анестезиология и реаниматология;
- Общая реаниматология.