

УДК 616.33-002.446+ 616.24:577.175.14: 579.842.1/.2+613.84

Системный и регионарный (слизистая оболочка желудка) цитокиновый потенциал у больных с хроническим обструктивным заболеванием легких и эрозивными поражениями гастродуоденальной зоны

А.Н. Нилова

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, Симферополь

Ключевые слова: цитокины, липофлавоны, бактериальный липополисахарид, эрозивный гастрит, хроническое обструктивное заболевание лёгких, табакокурение

Курение относится к главным этиологическим факторам развития хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ) и способствует активации клеток (прежде всего – бронхолегочной системы) с последующим возрастанием не только регионарного, но и системного цитокинового потенциала, повышенным синтезом хемотаксических факторов, радикалов кислорода и протеаз [4, 11, 16]. Roussos A. и соавт. (2006) указывают, что именно повышение системного цитокинового потенциала может выступать не только как общий фактор риска развития и патогенеза ХОЗЛ и Н. pylori-ассоциированных заболеваний гастродуоденальной зоны, но в качестве "фактора взаимного отягощения" течения каждого из этих заболеваний [15]. Особый интерес, по нашему мнению, представляют исследования Lee C.W. и соавт. (2007), доказывающих патогенетическую значимость цитокинов и в развитии Н. pylori-независимого гастродуоденита [20].

В исследовании Parasher G., Eastwood G.L. (2000) выявлено, что курение является самостоятельным ультраогненным фактором, существенно нарушает моторику желудка, снижает эффективность противоязвенной терапии, способствует развитию дуоденогастрального рефлюкса, повышает риск инфицирования Н. pylori за счет резкого снижения антибактериальной защиты [8, 14].

Очевидная причастность различных цитокинов к патогенезу многих хронических воспалительных заболеваний внутренних органов (включая ХОЗЛ, Н. pylori-ассоциированных болезней, аутоиммунных заболеваний и др.), по мнению

многих исследователей позволяет утверждать, что антицитокиновая терапия может стать новым перспективным направлением базисной терапии этих заболеваний [6, 10, 12, 21].

Таким образом, продолжение научного поиска по изучению роли табакокурения как "цитокин-ассоциированного" патогенетического фактора сочетанного течения эрозивно-язвенных поражений гастродуоденальной зоны и ХОЗЛ, а также влияния липофлавонов на цитокиновый гомеостаз представляется нам весьма перспективным направлением, так как открывает новые пути дифференцированной терапии данной группы заболеваний.

Общей целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности применения липосомальной формы флавоноида кверцетина – липофлавона в комплексном лечении хронических эрозивных поражений желудка (на этапе после эрадикации Н. pylori) у больных ХОЗЛ с длительным стажем табакокурения. В рамках указанной цели в статье представлены результаты исследования особенностей системного и регионарного (слизистая оболочка желудка) цитокинового потенциала, а также влияния липофлавонов на уровень цитокинов в культуральной среде культуры клеток эпителия антрального отдела желудка больных хроническим эрозивным гастритом в зависимости от наличия фоновой хронической бронхообструктивной патологии и фактора длительного табакокурения.

Материал и методы

Обследовано 92 больных хроническим эрозивным гастритом (Н. pylori-негативные, либо после подтвержденной эрадикации Н. pylori до поступления в стационар), находившихся на стационарном лечении и разделенных на следующие группы: в 1-ю группу вошли 39 больных эрозивным гастритом, никогда не курившие, во 2-ю группу – 21 больной эрозивным гастритом, протекавшим в сочетании с ХОЗЛ II – III стадий и отрицающих факт курения в анамнезе. 3-я группа включала 32 больных эрозивным гастритом, протекающим в сочетании с ХОЗЛ II – III стадий, имеющих стаж курения более 10 лет. Контролем служили 22 здоровых донора, никогда не курившие (здоровые лица).

Концентрацию цитокинов IL-1 β и IL-4 в сыворотке крови и культуральной среде культуры клеток эпителия желудка определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов (ООО "Цитокины" IL-1 β , протеиновый контур – TNF- α , IL-4). Оценка результатов осуществляется фотометрически.

Нами использован метод краткосрочных органных культур, обеспечивающий культивирование клеток эпителия слизистой оболочки антрального отдела желудка (которые получали из образцов ткани, взятых при биопсии во время проведения фиброгастродуоденоскопии) *in vitro* по Лурия Е.А. [1, 2], согласно которому обеспечиваются изоляция клеточных элементов от организма и условия, при которых в клетках могут поддерживаться обменные процессы и осуществляться некоторые функции, не требующие длительной пролиферации и многоэтапной диф-

Уровень IL-1β, IL-4 и TNF-α в сыворотке крови у больных 1-й, 2-й и 3-й групп, пг/мл

Группа	Стат. показ.	IL-1β	IL-4	TNF-α
1-я группа	M ± m n p	38,50 ± 1,35 39 < 0,01	6,94 ± 0,25 39 < 0,1	17,13 ± 0,62 39 < 0,02
2-я группа	M ± m n p p ₁	52,55 ± 2,10 21 < 0,001 < 0,001	7,42 ± 0,22 21 < 0,001 < 0,2	22,50 ± 0,96 21 < 0,001 < 0,02
3-я группа	M ± m n p p ₁ p ₂	62,89 ± 1,55 32 < 0,001 < 0,001 < 0,001	7,60 ± 0,24 32 < 0,001 < 0,1 > 0,5	26,01 ± 1,11 32 < 0,001 < 0,001 < 0,02
Здоровые лица	M ± m n	34,40 ± 0,21 22	6,39 ± 0,22 22	15,08 ± 0,57 22

Примечание: p - достоверность различий, высчитанная в сравнении с группой здоровых лиц, p₁ - достоверность различий, высчитанная в сравнении с 1-й группой больных, p₂ - достоверность различий, высчитанная в сравнении со 2-й группой больных.

ференцировки. Культивация проводилась в присутствии антибиотиков (бензилпенициллина натриевой соли 1000 ЕД и стрептомицина сульфата 0,01 г на 1 мл культуральной среды) при 37°C.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования уровня IL-1β, IL-4 и TNF-α в сыворотке крови у больных 1-й, 2-й и 3-й групп представлены в Табл. 1

Анализ представленного в табл. 1 цифрового материала свидетельствует, что повышение уровней IL-1β в системном кровотоке выявлено у больных всех исследованных групп. При этом если у больных 1-й группы исследованный показатель повышен на 11,9 %, то у больных 2-й и 3-й групп – соответственно на 52,8 % и 82,8 %.

Известно, что в системном кровотоке цитокиновый потенциал во многом зависит от функциональной (цитокинпродуцирующей) активности лимфоцитов, которые, в частности, под влиянием компонентов табачного дыма синтезируют лимфокины (растворимые факторы – IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) – наиболее важный класс цитокинов, вовлеченных в реализацию иммунного ответа [14, 15]. Так, в частности, активированные конденсатом сигаретного дыма CD8+ Т-клетки могут синтезировать IL-4 [7, 17]. Нами установлено (табл. 1), что уровень IL-4 в сыворотке крови у больных 1-й группы не выходит за пределы диапазона его физиологических колебаний, а у больных 2-й и 3-й групп – повышен соответственно на 16,1 % и 18,9 %.

У больных 1-й группы выявлено повышение уровня провоспалительного цитокина TNF-α на 13,6 %, у больных 2-й и 3-й групп – соответственно на 49,2 % и 72,5 %. Таким образом, нами установлено, что течение эрозивного процесса в гастродуоденальной зоне характеризуется повышением системного цитокинового потенциала, а ХОЗЛ и длительный стаж курения являются самостоятельными факторами

риска возрастания уровня IL-1β, IL-4 и TNF-α в системном кровотоке, что, по нашему мнению, можно рассматривать как важный патогенетический механизм хронизации и прогрессирования эрозий желудка.

Результаты исследования регионарного (эпителий слизистой оболочки желудка) уровня IL-1β, IL-4 и TNF-α в культуральной среде культуры клеток эпителия желудка больных 1-й, 2-й и 3-й групп представлены в Табл. 2

Как видно из табл. 2, у больных 1-й группы под влиянием преинкубации клеток эпителия с ЛПС синтез IL-1β возрастает на 71,7 %, а в экспериментальной модели с преинкубацией клеток с липофлавоном – снижается на 16,7 %. У больных 2-й и 3-й групп исследованный показатель на первом этапе эксперимента статистически значимо выше (соответственно на 55,1 % и 69,0 %), чем у больных 1-й группы, достоверно возрастает под влиянием ЛПС-стимула (соответственно на 55,8 %, а под влиянием преинкубации

29,5 % и 38,3,0 %) и снижается (соответственно на 11,6 % и 13,3 %) в опыте с преинкубацией клеток с липофлавоном. Обращает на себя внимание, что у больных ХОЗЛ в эксперименте 1 фактор табакокурения (3-я группа больных) существенно не влияет на уровень IL-1β в культуральной среде. Вместе с тем под влиянием ЛПС-стимула у больных 3-й группы исследованный показатель статистически значимо выше, чем у больных 2-й группы. Таким образом, нами установлено, что у больных ХОЗЛ регионарный (слизистая оболочка желудка), а также эндотоксин(ЛПС)-индуцированный потенциал IL-1β существенно выше, чем у больных без фоновой хронической бронхолегочной патологии. Доказано также, что фактор курения является фактором риска повышения регионарного (слизистая оболочка желудка) ЛПС-опосредованного цитокинового потенциала (IL-1β). Результаты наших экспериментов также документируют антицитокиновое (синтез клетками IL-1β) действие липофлавона в экспериментальных моделях у больных всех трех групп.

При осмыслении полученных результатов нами также учитывалось, что помимо эпителиальных клеток IL-1β синтезируют до 90 % моноцитов периферической крови и до 60 % тканевых макрофагов; IL-1β играет исключительно важную регуляторную роль в иммуногенезе [3, 5]. Sato Y. и соавт. (1999), Luo J.C. и соавт. (2004) установлено, что не только у больных, но и у здоровых людей клетки эпителия желудка и кишечника синтезируют многочисленные цитокины, включая TNF-α и лимфокин IL-4 [18, 19].

Результаты наших исследований свидетельствуют, что у больных 1-й группы под влиянием преинкубации клеток эпителия с ЛПС синтез IL-4 возрастает на 55,8 %, а под влиянием преинкубации

Табл. 2

Влияние липофлавона на ЛПС-индуцированный синтез IL-1β, IL-4 и TNF-α клетками эпителия желудка больных 1-й, 2-й и 3-й групп, пг/мл

Этапы эксперимента	Стат. показ.	1-я группа			2-я группа (+ ХОЗЛ)			3-я группа (+ ХОЗЛ + табакокурение)		
		IL-1β	IL-4	TNF-α	IL-1β	IL-4	TNF-α	IL-1β	IL-4	TNF-α
Эксперимент 1	M ± m	10,8 ± 0,4	3,2 ± 0,2	12,2 ± 0,4	16,8 ± 0,6	4,9 ± 0,2	16,9 ± 0,6	18,3 ± 0,8	5,6 ± 0,2	19,8 ± 0,7
	n	39	39	39	21	21	21	32	32	32
	p	-	-	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	p ₁	-	-	-	-	-	-	< 0,2	< 0,02	< 0,01
Эксперимент 2	M ± m	18,5 ± 0,8	5,0 ± 0,1	17,1 ± 0,6	21,7 ± 0,8	8,0 ± 0,4	23,5 ± 0,9	25,2 ± 1,1	9,8 ± 0,3	26,7 ± 1,1
	n	39	39	39	21	21	21	32	32	32
	p	-	-	-	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	p ₁ p ₂	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,05 < 0,001
Эксперимент 3	M ± m	15,4 ± 0,6	4,0 ± 0,2	13,8 ± 0,4	19,2 ± 0,8	5,3 ± 0,2	21,8 ± 0,6	21,9 ± 0,9	7,0 ± 0,2	24,7 ± 1,0
	n	39	39	39	21	21	21	32	32	32
	p	-	-	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	p ₁ p ₂ p ₃	< 0,001 < 0,01 < 0,01	< 0,01 < 0,001 < 0,001	< 0,01 < 0,001 < 0,001	< 0,02 < 0,05 < 0,001	< 0,5 < 0,001 < 0,2	< 0,001 < 0,2 < 0,2	< 0,01 < 0,02 < 0,001	< 0,01 < 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,02 < 0,001

Примечание: p - достоверность различий, высчитанная в сравнении с 1-й группой больных в соответствующем эксперименте, p₁ - достоверность различий, высчитанная в сравнении со 2-й группой больных в соответствующем эксперименте, p₂ - достоверность различий, высчитанная в сравнении с экспериментом 1 в той же группе больных, p₃ - достоверность различий, высчитанная в сравнении с экспериментом 2 в той же группе больных.

эпителиальных клеток с липофлавоном – снижается на 18,9 %. Нами также выявлено статистически значимое изменение синтеза IL-4 клетками эпителия желудка при наличии ХОЗЛ, а также длительного стажа табакокурения: у больных 2-й и 3-й групп исследованный показатель на первом этапе эксперимента статистически значимо выше (соответственно на 53,9 % и 75,2 %), чем у больных 1-й группы. В эксперименте 2 под влиянием ЛПС-стимула исследованный показатель у больных 2-й и 3-й группы возрастает соответственно на 63,7 % и 75,7 % и статистически значимо снижается (соответственно на 34,1 % и 28,4 %) в экспериментальной модели с липофлавоном.

Таким образом, у больных с эрозиями желудка фактор табакокурения выступает в качестве фактора отягощения регионального (эпителий желудка) цитокинового дисбаланса и суммируется с "ХОЗЛ-индуцированным" повышением IL-4 in loco morbi.

Установлено также, что у больных 2-й группы исходный (в эксперименте 1) уровень TNF-α в культуральной среде на 39,1 % ($p < 0,001$) выше, чем у больных 1-й группы, а у больных 3-й группы – на 17,2 % ($p_1 < 0,01$) выше, чем у больных 2-й

группы. Таким образом, наличие ХОЗЛ, а также табакокурение являются самостоятельными факторами риска повышенного синтеза TNF-α клетками эпителия желудка у больных с эрозиями желудка.

Под влиянием ЛПС-стимула у больных 1-й, 2-й и 3-й групп уровень синтезируемого клетками цитокина TNF-α возрастает на 40,5-34,8 % ($p_2 < 0,001$), а под влия-

нием преинкубации клеток с липофлавоном (эксперимент 3) наступает "отмена" ЛПС-стимула только в культуре клеток больных 1-й группы: показатель снижается на 19,2 % ($p_3 < 0,001$). Указанные науч-

ные факты свидетельствуют, что антици-

токиновое действие липофлавона, помимо IL-1β и IL-4, включает ингибицию синтеза клетками эпителия TNF-α. только у больных 1-й группы.

Выводы

1. Особенностью патогенеза эрозивных поражений желудка у лиц с ХОЗЛ и длительным стажем табакокурения является повышенный уровень IL-1β, IL-4 и TNF-α в системном кровотоке, а также повышенный синтез (включая ЛПС-индуцированный) цитокинов IL-1β, IL-4 и TNF-α эпителиальными клетками желудка.

2. Обнаружено липофлавоном-опосредованное снижение ЛПС-индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов клетками эпителия желудка у больных ХОЗЛ с длительным стажем табакокурения. Указанные факты можно расценивать как научное обоснование целесообразности использования липофлавона для коррекции функциональной (синтез провоспалительных цитокинов) активности клеток эпителия слизистой оболочки желудка у больных ХОЗЛ, прежде всего, у лиц с длительным стажем курения.

Литература

1. Аурия Е.А. Кровотворная и лимфоидная ткань в культурах. – М.: Медицина, 1972. – 176 с.
2. Аурия Е.А. Органические культуры кровотворной и лимфоидной ткани: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук: 03.099 / Академия мед. наук СССР. – М., 1972. – 37 с.
3. Симбирцев А.С. Биология семейства интерлейкина-1 человека // Иммунология. – 1998. – №3. – С.9–17.
4. Чуалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких. – М.: ЗАО "ИЗ-во БИНОМ", СПб.: Невский Диалект, 1998. – 512 с.
5. Шхитек Э.К., Рыбакина Е.Г., Корнева Е.А. Интерлейкин-1 в реализации иммунонейроэндокринных взаимосвязей // Успехи соврем. биол. – 1993. – Т.113, Вып.1. – С.95–104.
6. Breedveld F. Therapeutic monoclonal antibodies // *Lancet*. – 2000. – Vol. 355. – P. 735-740.
7. Differing lymphokine profile of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones / Salgame P.,

Abrams J.S., Clayberger C., et al. // *Sci.* - 1997. - Vol. 254. - P.279–282.

8. Enhanced *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells is associated with alterations in cytoskeleton induced by nicotine / Y.-H.Chen, S.H.-M.Chen, A.Jong et al. // *Cell. Microbiol.* - 2002. - Vol. 4, N.8. - P. 503–514.

9. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma / Q.Hamid, M.Azzawi, Y.Sun, et al. // *J. Clin. Invest.* - 1997. - Vol. 87. - P. 1541–1549.

10. Kalden J.R. Emerging role of anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatic disease // *Arthritis Res.* - 2002. - Vol. 4, Suppl. 2. - P. 34–40.

11. Laan M., Bozinovski S., Anderson G.P. Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells // *J. Immunol.* - 2004. - Vol. 15, №173(6). - P.4164-4170.

12. Lorenz H.-M., Kalden J.R. Perspectives for TNF-α-targeting therapies // *Arthritis Res.* - 2002. - Vol. 4, Suppl. 3. - P. 17–24.

13. Mossman T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol.* - 1996. - Vol. 7. - P.145–173.

14. Parascher G., Eastwood G.L. Smoking and peptic ulcer in the *Helicobacter pylori* era // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* - 2000. - Vol. 12. - P. 843-853.

15. Respiratory Diseases and *Helicobacter pylori* Infection: Is There a Link? / A.Roussos, N.Philippou, G.J-Mantzaris, K.I.Gourgoulis // *Respir.* - 2006. - Vol. 73. - P. 708-714.

16. Rodgman A., Smith C.J., Perfetti T.A. The composition of cigarette smoke: A retrospective, with emphasis on polycyclic components // *Hum. Exp. Toxicol.* - 2000. - Vol.19. - P.573–595.

17. Salgame P., Conitt J., Bloom B.R. Immunological suppression by human CD8+ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1999. - Vol. 88. - P.2598–2602.

18. Sato Y., Matsumori A., Sasayama S. Inotropic agent vesnarinone inhibits cytokine production in human endothelial cells // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 1999. - Vol. 27. - P. 2265-2273.

19. Tumor necrosis factor – stimulates gastric epithelial cell proliferation / J.C.Luo, V.Y.Shin, W.K.Wu et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* - 2004. - Vol. 10. - P. 1152-1158.

20. Wild-Type and Interleukin-10-Deficient Regulatory T Cells Reduce Effector T-Cell-Mediated Gastroenteritis in Rag2-/- Mice, but Only Wild-Type Regulatory T Cells Suppress *Helicobacter pylori* Gastritis / C.W.Lee, V.P.Rao, A.B.Rogers et al. // *Infect. Immun.* - 2007. - Vol. 75, № 6. - P. 2699-2707.

21. Yamagata T., Ichinose M. Agents against cytokine synthesis or receptors // *Eur. J. Pharmacol.* - 2006. - Vol. 8, № 533(1-3). - P. 289-301.

Системний та регіонарний (слизова оболонка шлунка) цитокіновий потенціал у хворих з хронічним обструктивним захворюванням легенів та ерозивними пошкодженнями гастродуоденальної зони

А.Н. Нілова

У хворих з *Helicobacter pylori*-негативним ерозивним гастритом вивчено цитокіновий потенціал і встановлено, що особливості патогенезу ерозивних уражень шлунка у осіб з хронічним обструктивним захворюванням легенів і тривалим стажем табакокурения є підвищений рівень IL-1β, IL-4 і TNF-α в системному кровотоку, а також підвищений синтез цитокінів культурою клітин епітелію слизової оболонки антрального відділу шлунка (отриманих при біопсії під час проведення фіброгастродуоденоскопії). Тривалий стаж тютюнопаління є самостійним чинником ризику формування цитокинового дисбалансу у хворих на *Helicobacter pylori*-негативний ерозивний гастрит. Виявлена можливість ліпофлавоном-опосередкованого зниження ліпополісахарид-індукованого синтезу прозапальних цитокінів клітинами епітелію шлунка у хворих на ХОЗЛ з тривалим стажем тютюнопаління.

Ключові слова: цитокіни, ліпофлавоном, бактеріальний ліпополісахарид, ерозивний гастрит, хронічне обструктивне захворювання легенів, тютюнопаління.

Systemic and regional (gastric mucosa) cytokine activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease and erosive lesions of gastroduodenal zone

A.N. Nilova

In patients with *Helicobacter pylori*-negative erosive gastritis cytokine activity was studied. It is established, that pathological peculiarities of gastric erosions in patients with chronic obstructive pulmonary disease and long term tobacco smoking are increased levels of IL-1 β , IL-4 and TNF- α in systemic circulation and increased cytokine' synthesis by cultured epithelium of antral mucosa (biopsied on gastroscopy). Long term tobacco smoking is independent risk factor of cytokine misbalance in patients with *Helicobacter pylori*-negative erosive gastritis. The possibility of lypoflavon-mediated decreasing of lipopolysaccharide-induced synthesis of pro-inflammatory cytokines by gastric epithelium in patients with COPD and long term tobacco smoking is revealed.

Key words: cytokines, lypoflavon, bacterial lipopolysaccharide, erosive gastritis, chronic obstructive pulmonary disease, tobacco smoking.