

УДК : 616.24+616.36-004:612.112

Динамика функциональной активности мононуклеарных лейкоцитов под влиянием активатора плазминогена мочевого типа у больных с сочетанной гепатопульмональной патологией

М. А. Захарова, В. Ф. Кубышкин

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

Ключевые слова: мононуклеарные лейкоциты, цитокины, цирроз печени, хроническое обструктивное заболевание лёгких

Известно, что в патогенезе хронических неспецифических заболеваний как печени, так и органов дыхания особое значение уделяется двум взаимосвязанным процессам: активности воспалительного (дистрофического) процесса и интенсивности фиброобразования [6, 7, 17, 24]. Обсуждается роль генетических дефектов в развитии генерализованного поражения эластических волокон, объясняющих такую сочетанную патологию, как эмфизема лёгких, цирроз печени (ЦП) и аневризмы сосудов [16]. Возможным подтверждением этой концепции является связь идентифицированного Ishii M. и Teramoto S. (2007) у больных ХОЗЛ гена E1A с повышенным синтезом TGF- β , ICAM-1 и IL-8 эпителиальными клетками [14]. Liebhart J. и соавт. (2005) относят генный полиморфизм TGF- β 1 к существенным факторам риска хронического обструктивного заболевания лёгких (ХОЗЛ), а Xue F. и соавт. (2003) – к факторам риска ЦП [26].

Нужно подчеркнуть, что расшифровка в последнее десятилетие цитокин-зависимых процессов инициации, течения и формирования исходов воспалительных процессов различного генеза и локализации существенно дополнила учение о воспалении [2, 8, 10]. В рамках же современной "цитокиновой" патогенетической концепции хронического воспаления к основным "цитокинпродуцирующим" клеткам относятся мононуклеарные лейкоциты [18]. Так, убедительно доказано модулирующее влияние мононуклеарных лейкоцитов на цитокиновый потенциал (включая фиброгенные цитокины) и на уровне тканей печени и лёгких [11].

С другой стороны, к активаторам (включая NF- β B-зависимым) синтеза ши-

рокого спектра цитокинов мононуклеарными лейкоцитами и клетками сосудистого эндотелия относятся такие факторы фибринолиза (образующиеся *in loco morbi*), как активаторы плазминогена – кровяной, тканевый, а также присутствующий в системном кровотоке мочевого (урокиназа, urokinase-type plasminogen activator – uPA) и активная форма фибринолитического фермента – плазмин [15]. Плазмин, плазминоген и активаторы плазминогена относятся к модуляторам репаративной регенерации как печени, так и слизистой оболочки бронхов и лёгочной паренхимы, а также TGF- β 1-зависимого апоптоза фибробласта – важнейшего момента в развитии фиброобразования [20, 21, 25].

Очевидная в рамках "цитокиновой" патогенетической концепции хронических заболеваний воспалительного характера научная обоснованность коррекции цитокинового (включая факторы роста) гомеостаза позволила, в частности, выявить пентоксифиллин-зависимую модуляцию синтеза лимфоцитами инсулиноподобного фактора роста, фактора роста фибробластов-2, а также ингибирующее влияние препарата на синтез и биологические эффекты TNF- α , IL-8 и IL-6 [9, 12, 19]. Эти факты явились для нас научной аргументацией включения в сферу научного поиска изучение пентоксифиллин-зависимой функциональной активности лейкоцитов.

Основной целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности применения пентоксифиллина для коррекции цитокинового (факторы роста) гомеостаза в комплексном лечении ЦП, протекающего в сочетании с

ХОЗЛ. В настоящей работе нами принята попытка подойти к проблеме расшифровки патогенетических особенностей сочетанного течения ХОЗЛ и ЦП с позиции оценки пентоксифиллин-зависимого uPA-индуцированного синтеза цитокинов мононуклеарными клетками в культуральном эксперименте *in vitro*.

Материал и методы

Под наблюдением состояло 35 больных ЦП (преимущественно – алкогольного генеза), разделенных на две группы. В 1-ю группу вошли 16 больных, страдающих ЦП (контрольная группа), во 2-ю группу – 19 больных с сочетанным течением ЦП и ХОЗЛ I-II степени тяжести (опытная группа).

Нами использован модифицированный метод краткосрочных органных культур, обеспечивающий культивирование мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* по Лурия Е.А. [3, 4]. Уровень цитокинов в культуральной среде культуры мононуклеарных лейкоцитов определяли иммуоферментным методом с использованием коммерческих наборов (ООО "Цитокины" (Россия) IL-1b, протеиновый контур – TNF- α , IL-4). Содержание в культуральной среде активной формы трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) определяли методом иммуоферментного анализа с использованием тест-системы "TGF β 1 Emax® ImmunoAssay System" (Promega, США). Оценка результатов осуществлялась фотометрически.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования пентоксифиллин-зависимого uPA -индуцированного

Влияние пентоксифиллина на uPA-индуцированный синтез цитокинов культурой мононуклеарных клеток у больных 1-й и 2-й групп, пг/мл культуральной среды

Показа-тель	Этап эксперимента	Стат. показ.	1-я группа, n = 16	2-я группа, n = 19
TGF-β1	Эксперимент 1 (уровень TGF-β1 в культуральной среде)	M ± m p p ₁	39,87 ± 1,39 - -	47,13 ± 1,55 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с uPA → культивация)	M ± m p p ₁	41,14 ± 1,68 > 0,5 -	49,92 ± 1,81 < 0,5 < 0,001
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с uPA → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p ₁	40,87 ± 1,43 > 0,5 -	45,83 ± 1,37 > 0,5 < 0,02
TNF-α	Эксперимент 1 (уровень TNF-α в культуральной среде)	M ± m p p ₁	15,25 ± 0,65 - -	19,59 ± 0,95 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с uPA → культивация)	M ± m p p ₁	17,61 ± 0,54 < 0,01 -	21,39 ± 0,96 < 0,2 < 0,001
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с uPA → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p ₁	16,88 ± 0,75 < 0,2 -	20,52 ± 0,97 < 0,5 < 0,01
IL-1β	Эксперимент 1 (уровень IL-1β в культуральной среде)	M ± m p p ₁	22,08 ± 0,75 - -	36,69 ± 1,71 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с uPA → культивация)	M ± m p p ₁	23,27 ± 0,91 < 0,5 -	35,90 ± 1,19 > 0,5 < 0,001
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с uPA → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p ₁	22,48 ± 0,56 > 0,5 -	35,25 ± 1,21 > 0,5 < 0,001
IL-4	Эксперимент 1 (уровень IL-4 в культуральной среде)	M ± m p p ₁	3,41 ± 0,15 - -	5,45 ± 0,31 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с uPA → культивация)	M ± m p p ₁	2,56 ± 0,12 < 0,001 -	4,14 ± 0,21 < 0,001 < 0,001
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с uPA → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p ₁	2,06 ± 0,10 < 0,001 -	3,05 ± 0,12 < 0,001 < 0,001

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

синтеза уровня цитокинов в культуральной среде культуры мононуклеарных клеток больных 1-й и 2-й групп представлены в табл. 1.

Анализ представленного в табл. цифрового материала свидетельствует, что динамики синтеза активной формы TGF-β1 культурой мононуклеарных клеток под влиянием uPA у больных как 1-й, так и 2-й групп не выявлено. Установлено также, что при отсутствии uPA-индуцированного синтеза активной формы TGF-β1 отсутствует и пентоксифиллин-зависимое снижение исследованного показателя (эксперимент 3).

Под влиянием инкубации клеток с uPA (эксперимент 2) имеет место статистически значимая стимуляция синтеза TNF-α мононуклеарными клетками только у больных 1-й группы (на 15,5 %, p < 0,01), а также возвращение величины исследованного показателя к исходному (в эксперименте 1) уровню в экспериментальной модели с пентоксифиллином (эксперимент 3). У больных 2-й группы уровень TNF-α в супернатанте культуры клеток под влиянием uPA и пентоксифиллина существенно не меняется. Таким образом, у больных с сочетанной гепатопульмональной патологией выявлена потеря uPA-индуцированного синтеза TNF-α монону-

клярными клетками, что может выступать в качестве существенного патогенетического механизма трансформации репаративной регенерации тканей в дисрегенерацию за счет нарушения кинетики воспалительного процесса [1, 5].

Нами также установлено, что уровень IL-1β в супернатанте культуры мононуклеарных клеток у больных 1-й и 2-й групп под влиянием инкубации клеток с uPA в экспериментах 2 и 3 в сравнении с экспериментом 1 (в той же группе) существенно не меняется.

Под влиянием инкубации клеток с uPA уровень лимфокина IL-4 в культуральной среде культуры мононуклеарных лейкоцитов у больных 1-й группы снижается на 24,9 % (p < 0,001), у больных 2-й группы – на 24,0 % (p < 0,001). В сравнении с экспериментом 2 под влиянием инкубации клеток с пентоксифиллином уровень лимфокина IL-4 также статистически значимо снижается у больных как 1-й, так и 2-й групп (достоверность различия между величиной показателя в экспериментах 2 и 3 меньше 0,01).

Указанные факты позволяют предположить, что *in vivo* uPA в очаге воспаления может оказывать антифибротический эффект путем ингибции синтеза мононуклеарами лимфокина IL-4, так как воз-

растание уровня IL-4 коррелирует с возростанием уровня TGF-β1 и, напротив, снижение уровня лимфокина приводит к резкому снижению уровня TGF-β1, уменьшению как легочного фиброза, так и фиброза печени [13, 22, 23]. Установлено также, что пентоксифиллин обладает способностью усиливать цитокин-модулирующее влияние uPA за счет возможного IL-4-опосредованного снижения уровня факторов роста в очаге воспаления.

Таким образом, анализ представленных нами научных фактов позволяет сделать следующие выводы:

1. У больных ЦП, протекающем в сочетании с ХОЗЛ, в культуральной экспериментальной модели выявлен повышенный синтез мононуклеарными лейкоцитами фактора роста TGF-β1, провоспалительных цитокинов (со свойствами факторов роста) TNF-α и IL-1β, а также лимфокина IL-4, что формирует условия для хронизации (прогрессирования) патологического процесса как в печени, так и в бронхолегочной системе.

2. Пентоксифиллин обладает способностью усиливать цитокин-модулирующее влияние uPA за счет возможного IL-4-опосредованного снижения уровня факторов роста в очаге воспаления.

Література

1. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
2. Ковальчук А.В., Ганковская А.В., Рубакова Э.П. Система цитокинов. – М.: Медицина, 1999. – 343 с.
3. Лурия Е.А. Кровотворная и лимфоидная ткань в культурах. – М.: Медицина, 1972. – 176 с.
4. Лурия Е.А. Органические культуры кровотворной и лимфоидной ткани: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук: 03.099 / Академия мед. наук СССР. – М., 1972. – 37 с.
5. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. – М.: Медицина, 1991. – 272 с.
6. Чуцалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких. – М.: ЗАО "ИЗ-ВО БИНОМ", СПб.: Невский Диалект, 1998. – 512 с.
7. Albanis E., Friedman S.L. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy // *Clin. Liver Dis.* - 2001. - N.5. - P.315 - 334.
8. Barnes P.J., Shapiro S.D., Pauwels R.A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms // *Eur. Respir. J.* - 2003. - Vol. 22. - P. 672-688.
9. Colson A., Willems B., Thissen J.P. Inhibition of TNF-alpha production by pentoxifylline does not prevent endotoxin-induced decrease in serum IGF-I // *J. Endocrinol.* - 2003. - Vol 178, №1. - P.101-109.
10. Fausto N., Laird A.D., Weber E.M. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration // *FASEB J.* - 1999. - Vol. 9. - P. 1527-1536.
11. Friedman S.L. Cytokines and fibrogenesis // *Semin. Liver Dis.* - 1999. - Vol. 19. - P. 129-140.
12. Gonta A., Dan G.-A., Codita I. Effects of pentoxifylline on TNF-alpha and endothelial dysfunction in patients with severe heart failure // *Eur. J. Heart Failure.* - 2000. - Vol. 2, Suppl.1. - P. 9-19.
13. Interleukin-4 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β 1 // *C.G.Lee, R.Homer, Z.Zhu et al. // J. Exp. Med.* - 2001. - Vol. 194. - P. 809-821.
14. Ishii M., Teramoto S. Respiratory infection in the pathogenesis of COPD // *Nipp. Rinsbo.* - 2007. - Vol. 65, № 4. - P. 617-622.
15. Jutel M. Adhesion molecules in allergic inflammation // *Allergology & Clinical Immunology International.* - 1999. - Vol. 5, № 3. - P. 153-158.
16. Kisselova T., Brenner D.A. Mechanisms of fibrogenesis // *Exper. Biol. Med.* - 2008. - Vol.233, N.2. - P. 109 - 122.
17. Mechanisms of pulmonary fibrosis // *V.J.Thannickal, G.B.Toews, E.S.White et al. // Annu. Rev. Med.* - 2004. - Vol. 55. - P. 395-417.
18. O'Donnell R., Breen D., Wilson S., Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD // *Thorax.* - 2006. - Vol. 61. - P. 448-454.
19. Pentoxifylline protects L929 fibroblasts from TNF-a toxicity via the induction of heme oxygenase-1 // *G.-S.Ob, H.-O.Pae, M.-K.Moon et al. // Biochem. Biophys. Resear. Commun.* - 2003. - Vol.302, №1. - P. 109-113.
20. Plasminogen activation induced pericellular fibronectin proteolysis promotes fibroblast apoptosis // *J.C.Horowitz, D.S.Rogers, R.H.Simon et al. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* - 2008. - Vol. 38, № 1. - P. 78-87.
21. Plasminogen deficiency results in poor clearance of non-fibrin matrix and persistent activation of hepatic stellate cells after an acute injury // *V.L.Ng, G.E.Sabla, H.Melin-Aldama et al. // J. Hepatol.* - 2001. - Vol. 35. - P. 781-789.
22. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis // *S.P.Atamas, V.V.Yurovsky, R.Wise et al. // Arthritis Rheum.* - 1999. - Vol.42. - P.1168-1179.
23. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-a and in the regulation of fibrosis // *R.Hernandez-Pando, D.Aguilar, M.L.Hernandez et al. // Eur. J. Immunol.* - 2004. - Vol. 34. - P. 174-183.
24. Safadi R., Friedman S.L. Hepatic fibrosis – role of hepatic stellate cell activation // *Med. Gen. Med.* 2002. - Vol.15, № 4. - P. 27.
25. Spurzem J.R., Rennard S.I. Pathogenesis of COPD // *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* - 2005. - Vol. 26. - P. 142-153.
26. TGF-beta1 gene polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease // *J.Liebbart, M.Polak, R.Dobek et al. // Pneumonol. Alergol. Pol.* - 2005. - Vol. 73, № 3. - P. 216-220.

Динаміка функціональної активності культури клітин мононуклеарних лейкоцитів під впливом активатора плазміногену сечового типу у хворих із поєднаною гепатопульмональною патологією

М. А. Захарова, В. Ф. Кубишкін

У хворих на цироз печінки, що протікає в поєднанні з хронічним обструктивним захворюванням легень вивчено вміст цитокинів у культуральному середовищі культури мононуклеарних лейкоцитів і виявлено підвищений uPA-індукований синтез мононуклеарним фактором росту TGF- β 1, прозапальних цитокинів (із властивостями факторів росту) TNF- α і IL-1 β , а також лімфокіну IL-4, що формує умови для прогресування патологічного процесу як в печінці, так і в бронхолегеневій системі. Під впливом введення в культуральне середовище пентоксифіліну виявлено посилення цитокін-модуючого впливу uPA за рахунок можливого IL-4-опосередкованого зниження рівня факторів росту.

Ключові слова: мононуклеарні лейкоцити, цитокини, цироз печінки, хронічне обструктивне захворювання легень.

Dynamic of functional activity mononuclear leucocytes cellular culture under influence of plasminogen activator of urinal type of patients with combined hepatopulmonary pathology

М. А. Zakharova, V. F. Kubyishkin

The increased uPA-induced synthesis of mononuclear growth factor TGF- β 1, antiinflammation cytokine (with the property of growth factor) TNF- α and IL-1 β , and lymphokine IL-4, that formed conditions to progress of pathology process both in hepar and broncho-pulmonary system in patients with liver cirrhosis plus chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was revealed in contain of cytokine in the cultural of mononuclear leucocytes. Strengthen of cytokine modulator influence uPA upon the growth factor decrease was revealed under influence of adding in culture pentoxifyllin.

Key words: mononuclear monocytes, cytokines, liver cirrhosis, chronic obstructive pulmonary disease.