

УДК : 616.36+ 616.24+ 616.155.3: 615.3

## Влияние пентоксифиллина на плазмин-индуцированную функциональную активность культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов у больных с сочетанной гепатопульмональной патологией

М. А. Захарова

*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, Симферополь.***Ключевые слова:** пентоксифиллин, плазмин, лейкоциты, цитокины, цирроз печени, хроническое обструктивное заболевание лёгких

В рамках современного учения о воспалении важнейшее участие мононуклеарных лейкоцитов в инициации, течении и разрешении воспалительных процессов любого генеза, характера и локализации (включая печень и бронхолегочную систему) представляется бесспорным [1]. В рамках же "цитокиновой" патогенетической концепции хронического воспаления мононуклеары относятся к основным "цитокинпродуцирующим" клеткам [12]. Убедительно доказано модулирующее влияние мононуклеарных лейкоцитов на цитокиновый потенциал (включая фиброгенные цитокины) и на уровне тканей печени и лёгких [7]. При гистохимическом исследовании также установлено, что помимо фагоцитов, Т-лимфоцитов при ХОЗЛ – наиболее часто встречающиеся, а при фиброзе печени – часто встречающиеся клетки in loco morbi [4, 6].

Известно также, что такие факторы фибринолиза (образующиеся in loco morbi), как активная форма фибринолитического фермента – плазмин, а также активаторы плазминогена относятся к активаторам (включая NF-κB-зависимым) синтеза широкого спектра цитокинов мононуклеарными лейкоцитами, клетками сосудистого эндотелия, а также активаторами системы MMPs [10]. Эффективная репаративная регенерация как печени, так и слизистой оболочки бронхов и легочной паренхимы, а также TGF-β1-зависимый апоптоз фибробласта (важнейший момент в развитии фиброзообразования) регулируются плазмином, плазминогеном и активаторами плазминогена [14, 15, 16].

Доказано существование системы плазмин-опосредованной активации фактора роста TGF-β1 и MMPs [9].

Поиск путей коррекции цитокинового гомеостаза при хронических воспалительных заболеваниях позволил 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 [5, 8, 13].

С учетом вышесказанного продолжение научного поиска по проблемам пентоксифиллин-зависимой функциональной активности лейкоцитов у больных с сочетанной гепатопульмональной патологией и оценка полученных фактов с саногенетических позиций представляется перспективным научным направлением, раскрывающим новые возможности дифференцированной терапии заболевания.

Основной целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности применения пентоксифиллина для коррекции цитокинового (факторы роста) гомеостаза в комплексном лечении цирроза печени, протекающего в сочетании с хроническим обструктивным заболеванием лёгких. в настоящей работе нами предпринята попытка подойти к проблеме расшифровки патогенетических особенностей сочетанного течения ХОЗЛ и ЦП с позиции оценки пентоксифиллин-зависимого плазмин-индуцированного синтеза цитокинов культурой мо-

нонуклеарных клеток в 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. [2, 3]. Уровень цитокинов в культуральной среде культуры мононуклеарных лейкоцитов определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов (ООО "Цитокины" (Россия) IL-11, протеиновый контур – TNF-α, IL-4). Содержание в культуральной среде активной формы трансформирующего фактора роста β1 (TGF-β1) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы "TGFβ1 Emax® ImmunoAssay System" (Promega, США). Оценка результатов осуществлялась фотометрически.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования пентоксифиллин-зависимого плазмин-индуцированного синтеза уровня цитокинов в культуральной среде культуры мононуклеарных клеток больных 1-й и 2-й групп представ-

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

Показатель	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 p1	39,87 ± 1,39 - -	47,13 ± 1,55 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с плазмином → культивация)	M ± m p p1	53,80 ± 1,80 < 0,001 -	58,78 ± 2,56 < 0,001 < 0,2
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с плазмином → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p1	41,20 ± 1,75 > 0,5 -	48,03 ± 1,67 > 0,5 < 0,001
TNF-α	Эксперимент 1 (уровень TNF-α в культуральной среде)	M ± m p p1	15,25 ± 0,65 - -	19,59 ± 0,95 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с плазмином → культивация)	M ± m p p1	23,08 ± 0,99 < 0,001 -	29,95 ± 1,48 < 0,001 < 0,001
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с плазмином → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p1	18,25 ± 0,88 < 0,01 -	22,52 ± 0,95 < 0,05 < 0,001
IL-1β	Эксперимент 1 (уровень IL-1β в культуральной среде)	M ± m p p1	22,08 ± 0,75 - -	36,69 ± 1,71 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с плазмином → культивация)	M ± m p p1	33,26 ± 1,58 < 0,001 -	51,28 ± 1,96 < 0,001 < 0,001
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с плазмином → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p1	26,92 ± 1,22 < 0,001 -	44,84 ± 1,67 < 0,001 < 0,001
IL-4	Эксперимент 1 (уровень IL-4 в культуральной среде)	M ± m p p1	3,41 ± 0,15 - -	5,45 ± 0,31 - < 0,001
	Эксперимент 2 (преинкубация клеток с плазмином → культивация)	M ± m p p1	6,05 ± 0,33 < 0,001 -	8,33 ± 0,38 < 0,001 < 0,001
	Эксперимент 3 (преинкубация клеток с плазмином → отмывание клеток → инкубация клеток с пентоксифиллином → культивация)	M ± m p p1	5,97 ± 0,40 < 0,001 -	7,65 ± 0,34 < 0,001 < 0,01

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.

лены в табл. 1

Нами установлено, что особенностью патогенеза сочетанного течения ЦП и ХОЗЛ является повышенный синтез фактора роста мононуклеарными лейкоцитами: у больных 2-й группы уровень активной формы TGF-β1 в культуральной среде на 18,2 % ( $p_1 < 0,001$ ) выше, чем у больных 1-й группы. В эксперименте 2 выявлена плазмин-индуцированная стимуляция синтеза клетками фактора роста: у больных 1-й группы уровень активной формы TGF-β1 в супернатанте культуры клеток возрастает на 34,9 % ( $p < 0,001$ ), у больных 2-й группы – на 24,7 % ( $p < 0,001$ ). В эксперименте 3 под влиянием преинкубации клеток с пентоксифиллином имеет место отмена плазмин-индуцированной стимуляции синтеза клетками эпителия бронхов TGF-β1: исследованный показатель возвращается к исходному (в опыте 1) уровню у больных как 1-й, так и 2-й групп.

Уровень цитокина TNF-α в культуральной среде культуры мононуклеарных клеток у больных 2-й группы на 28,5 % ( $p_1 < 0,001$ ) выше, чем у больных 1-й группы, а под влиянием инкубации клеток с плазмином имеет место статистически значимая стимуляция синтеза TNF-α мононуклеарными клетками у больных как 1-й (на 51,3 %,  $p < 0,001$ ), так и 2-й (на 52,9 %,  $p < 0,001$ ) групп. Ранее синтез TNF-α мононуклеарными клетками (при дерматологической патологии) исследовали Карр А. и соавт. (1997) [11].

Выявлено также, что в эксперименте 3

исследованный показатель TNF-α статистически значимо снижается (достоверность различий между экспериментом 2 и 3 в одной и той же группе больных  $< 0,001$ ), но не достигает исходного (в эксперименте 1) уровня.

Нами также установлено, что у больных 2-й группы уровень IL-1β в супернатанте культуры мононуклеарных клеток на 66,2 % ( $p_1 < 0,001$ ) выше, чем у больных ЦП без фоновой патологии бронхолегочной системы (1-я группа) и продолжает оставаться достоверно повышенным (в сравнении с 1-й группой) в экспериментах 2 и 3. Под влиянием инкубации клеток с активной формой фибринолитического фермента – плазмином исследованный показатель возрастает на 50,6–39,8 % ( $p < 0,001$ ) у больных как 1-й, так и 2-й групп, а в опыте 3 под влиянием пентоксифиллина имеет место частичная отмена плазмин-индуцированного синтеза IL-1β: показатель у больных 1-й и 2-й групп снижается, но не возвращается к исходному (в эксперименте 1) уровню.

Исходный (в опыте 1) уровень лимфокина IL-4 в культуральной среде культуры мононуклеарных лейкоцитов у больных 2-й группы существенно выше (на 59,8 %,  $p_1 < 0,001$ ) чем у больных 1-й группы, статистически значимо возрастает в экспериментальной модели с преинкубацией клеток с плазмином (на 77,4 – 52,8 %,  $p < 0,001$ ) и не меняется под влиянием инкубации клеток с пентоксифиллином (эксперимент 3).

Таким образом, результаты наших экспериментов документируют антицитоки-

новое (плазмин-индуцированный синтез мононуклеарными лейкоцитами TGF-β1, TNF-α и IL-1β) действие пентоксифиллина в витральном эксперименте.

## Выводы

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 плазмин-индуцированный 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 модулировать плазмин-индуцированный синтез мононуклеарными лейкоцитами TGF-β1, TNF-α и IL-1β, что является патофизиологическим обоснованием использования препарата в комплексной (антифибротической) терапии сочетанной гепатопульмональной патологии.

## Литература

1. Лебедев К.А., Понякина П.А. Иммунограмма в клинической практике. – М.: Наука, 1990. – 224 с.
2. Аурия Е.А. Кровотворная и лимфоидная ткань в культурах. – М.: Медицина, 1972. – 176 с.
3. Аурия Е.А. Органичные культуры кровотоковой и

- лимфоидной ткани: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук: 03.099 / Академия мед. наук СССР. - М., 1972. - 2000. - Vol. 2, Suppl. 1. - P. 9-19.
- 37 с.
4. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview / Di Stefano A., Caramori G., Ricciardolo F.L. et al. // *Clin. Exp. Allergy*. - 2004. - Vol. 34(8) - P. 1156-1167.
5. 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.
6. Diehl A.M. Cytokine regulation of liver injury and repair // *Immunol. Rev.* - 2000. - Vol. 174. - P. 160-171.
7. Friedman S.L. Cytokines and fibrogenesis // *Semin. Liver Dis.* - 1999. - Vol. 19. - P. 129-140.
8. 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.
9. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure / S. Heymans, A. Luttun, D. Nyens et al. // *Nat. Med.* - 1999. - Vol. 5. - P. 1135-1142.
10. Jutel M. Adhesion molecules in allergic inflammation // *Allergy & Clinical Immunology International*. - 1999. - Vol. 5, № 3. - P. 153-158.
11. Kapp A., Textor A., Krutmann J., Moller A. Immunomodulating cytokines in atopic dermatitis and psoriasis: production of tumour necrosis factor and lymphotxin by mononuclear cells in vitro // *Br. J. Dermatol.* - 1997. - Vol. 122(5). - P. 587-592.
12. O'Donnell R., Breen D., Wilson S., Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD // *Thorax*. - 2006. - Vol. 61. - P. 448-454.
13. Pentoxifylline protects L929 fibroblasts from TNF- $\alpha$  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.
14. 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.
15. 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-Aldana et al. // *J. Hepatol.* - 2001. - Vol. 35. - P. 781-789.
16. Spurzem J.R., Rennard S.I. Pathogenesis of COPD // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* - 2005. - Vol. 26. - P. 142-153.

## Вплив пентоксифіліну на плазмін-індуковану функціональну активність культури клітин мононуклеарних лейкоцитів у хворих з поєднаною гепатопульмональною патологією

М. А. Захарова

У хворих на цироз печінки (ЦП), що протікає в поєднанні з хронічним обструктивним захворюванням легенів (ХОЗЛ), вивчено вміст цитокінів у культуральному середовищі культури мононуклеарних лейкоцитів і встановлено, що при поєднаній гепатопульмональній патології зростає плазмін-індукований синтез мононуклеарними лейкоцитами фактора росту TGF- $\beta$ 1, прозапальних цитокінів (із властивостями факторів росту) TNF- $\alpha$  і IL-1 $\beta$ , а також лімфокіну IL-4, що формує умови для хронізації (прогресування) патологічного процесу як в печінці, так і в бронхолегеневій системі. Під впливом введення в культуральне середовище пентоксифіліну плазмін-індукований синтез мононуклеарними лейкоцитами TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  і IL-1 $\beta$  знижується, що є патофізіологічним обґрунтуванням використання препарату в комплексній (антифібротичній) терапії поєднаної гепатопульмональної патології.

Ключові слова: пентоксифілін, плазмін, лейкоцити, цитокіни, цироз печінки, хронічне обструктивне захворювання легенів.

## The influence of pentoxifylline upon plasmin-induced functional activity of cellular culture of mononuclear leukocytes in patients with combined hepato-pulmonary pathology

M. A. Zakharova

In patients with liver cirrhosis (LC) in combination with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) the concentration of cytokines in culture medium of mononuclear leucocytes was established. It is proved, that mononuclear leucocytes increase plasmin-induced synthesis of ground factor TGF- $\beta$ 1, pro-inflammatory cytokines (with ground factor features) TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and lymphokine IL-4 in combined hepatopulmonary pathology. It forms background for chronic course (progression) of pathology not only in the liver, but also in bronchopulmonary system. The plasmin-induced synthesis by mononuclear leucocytes of ground factors TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  decreases upon the influence of pentoxifylline in culture medium. This fact is pathogenetical grounding of the usage of the medicine in the complex (antifibrotic) therapy of combined hepatopulmonary pathology.

Key words: pentoxifylline, plasmin, leucocytes, cytokines, liver cirrhosis, chronic obstructive pulmonary disease.