

УДК: 616.24.5+616-85

## Динамика остеопротегерин–опосредованного синтеза TNF- $\alpha$ клетками эпителия бронхов под влиянием липофлавона у больных ХОЗЛ, перенесших туберкулез легких

Н.В. Обухова

*ГУ «Донецкий государственный медицинский университет, Донецк***Ключевые слова:** остеопротегерин, TNF- $\alpha$ , бронхиальный эпителий, хроническое обструктивное заболевание лёгких, туберкулёз лёгких

**К** факторам, способствующим углублению цитокинового дисбаланса у больных хроническим обструктивным заболеванием легких (ХОЗЛ) относят, в частности, перенесенный туберкулез (ТВС) легких, выступающий в качестве клинического маркера резкого снижения многочисленных защитных «барьеров» системы органов дыхания [2]. Попытки использования терапевтической «анти-TNF-стратегии» у больных ХОЗЛ, перенесших ТВС (или со скрытым ТВС), как указывают Hamdi H. и соавт. (2006) [3], Saliu O. и соавт. (2006) [5] вскрыли главное осложнение анти-TNF-терапии – реактивацию скрытой ТВС инфекции. Так, было установлено, что под влиянием TNF-антагонистов (etanercept, infliximab, adalimumab) уменьшается субпопуляция и функциональная активность «антимикобактериальных CD4+ Т-клеток памяти, способных подавлять микобактерии путем синтеза IFN- $\gamma$  [3, 5]. В этой связи особый интерес, по нашему мнению, заслуживает использование в лечении больных ХОЗЛ, перенесших туберкулезный процесс, препаратов с антицитокиновой активностью, не относящихся непосредственно к анти-TNF-препаратам.

В свете вышеизложенного можно предположить, что дальнейший поиск методов коррекции дисбаланса цитокинового гомеостаза – важного патогенетического механизма прогрессирования ХОЗЛ, можно отнести к актуальным проблемам современной пульмонологии.

Основной целью исследования явилось научное

обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности оптимизированной базисной терапии для коррекции регионарного (эндобронхиального) остеопротегерин-зависимого дисбаланса цитокинового гомеостаза при хроническом обструктивном заболевании легких у лиц, перенесших ТВС легких. В настоящей работе нами представлены результаты изучения у подобных больных регионарного (в индуцированной мокроте) уровня остеопротегерина, а также модулирующего влияния липофлавона на остеопротегерин–опосредованную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза TNF- $\alpha$  клетками эпителия бронхов.

### Материал и методы

Под наблюдением состояло 83 больных ХОЗЛ (I–II степени тяжести, стабильное течение), которых распределили следующим образом: в 1-ю группу вошли 41 больной ХОЗЛ, 2-ю группу составили 42 больных ХОЗЛ, перенесшие различные формы ТВС легких. Контролем служили 14 здоровых лиц, у которых бронхоальвеолярные смывы получали при диагностической бронхоскопии, проводимой по поводу спорных клинических ситуаций (призывники), и у которых после комплексного обследования патологические изменения в бронхолегочной системе найдены не были.

Концентрацию остеопротегерина в индуцирован-

ной мокроте (которую собирали после многократной ингаляции гипертонического раствора хлорида натрия через небулайзер) определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов Human Osteoprotegerin (OPG) ELISA Kit компании Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG (Австрия). Оценка результатов осуществлялась фотометрически.

Для культивации клеток эпителия бронхов использован метод краткосрочных органных культур, обеспечивающий культивирование клеток *in vitro*. Культивация проводилась в присутствии антибиотиков (бензилпенициллина натриевой соли 1000 ЕД и стрептомицина сульфата 0,01 г на 1 мл культуральной среды). Клетки эпителия бронхов получали из мокроты. Параллельно проводились несколько экспериментов – опыт 1: введение в культуральную среду взвеси LPS-индуцированных аутологичных мононуклеарных лейкоцитов → уровень цитокина в культуральной среде; опыт 2: преинкубация мононуклеаров с остеопротегерином (20000 пг/мл среды; использовался Osteoprotegerin (OPG) human, recombinant, Sigma-Aldrich, США) → отмывание клеток → в культуральную среду; опыт 3: преинкубация мононуклеаров с остеопротегерином (20000 пг/мл среды) → отмывание клеток → инкубация клеток с липофлавоном → отмывание клеток → в культуральную среду.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из гепаринизированной крови центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографина. LPS получали из штаммов *E. coli* K 30 и C 600(lux) (R-мутанты) по методу Westphal O. (1984) [6]. Мягкий гидролиз нативного LPS проводили уксусной кислотой. Концентрацию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для определения уровня уровня TNF-а были использованы тест-системы и реагенты тест-

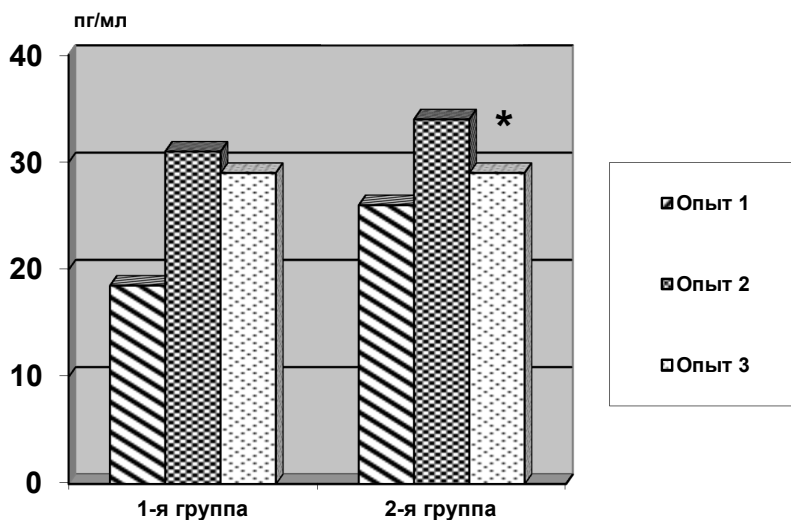
системы ProCon НПО «Протеиновый контур» (Россия).

## Результаты и обсуждение

Накопленные в последнее десятилетие научные факты позволили сформулировать научную концепцию остеопротегерин-зависимых механизмов формирования остеопенического синдрома у больных ХОЗЛ [6]. С другой стороны, у больных ХОЗЛ выявлена системно-регионарная дискретность содержания остеопротегерина: снижение в системном кровотоке, «регламентируемое» степенью тяжести заболевания, а также существенное повышение регионарного (эндобронхиального) содержания цитокина. Механизмы разнонаправленной динамики содержания остеопротегерина в общем кровотоке и *in loco morbi* (на уровне тканей бронхов) остаются предметом научной дискуссии [6].

При исследовании уровня остеопротегерина в индуцированной мокроте нами установлено, что в группе здоровых лиц исследованный показатель составляет  $2565,45 \pm 109,28$  пг/мл на ед. белка, а у больных 1-й и 2-й групп уровень цитокина в индуцированной мокроте повышен соответственно в 5,6 раз и 7,4 раза ( $p < 0,001$ ). При этом уровень остеопротегерина в индуцированной мокроте у больных 2-й группы на 32,3% ( $p1 < 0,001$ ) выше, чем у больных 1-й группы. Таким образом, перенесенный ТВС легких является «фактором отягощения» риска формирования остеопенического синдрома у больных ХОЗЛ. Ранее повышение уровня остеопротегерина в индуцированной мокроте у больных ХОЗЛ выявлено То М. и соавт. (2011) [4].

Нами также установлено (рис.), что под влиянием преинкубации LPS-индуцированных аутологичных мононуклеарных лейкоцитов с 20000 пг/мл среды человеческого остеопротегерина (опыт 2) уровень



\*-отмечено достоверное различие в сравнении с опытом 2

**Рис. 1.** Влияние липофлавона на остеопротегерин-зависимую лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза провоспалительного цитокина TNF-а клетками эпителия бронхов у больных 1-й и 2-й групп

TNF- $\alpha$  в супернатанте культуральної середої культури кліток бронхіального епітелію у больних 2-ї групи (в опыте 2) статистично значимо вище, чем у больних 1-ї групи. В опыте 2 дослідований показатель у больних как 1-ї, так и 2-ї груп существенно возрастает (в сравнении с опытом 2) соответственно на 75,6% и 43,9% ( $p < 0,001$ ), что документує наличие у больних ХОЗЛ остеопротегерин-зависимого мононуклеаро-опосередованного механізму синтезу TNF- $\alpha$  клітками епітелію бронхів. В опыте 3 виявлено, что інкубація кліток с ліпофлавоном частично «отменяет» інгібіруюче впливание остеопротегерина на синтез провоспалительного цитокіну TNF- $\alpha$  клітками епітелію бронхів только у больних 2-ї групи: в сравнении с опытом 2 дослідований показатель снижается на 15,6% ( $p < 0,01$ ).

## Выводы

У больних ХОЗЛ (ХОЗЛ I-II стадії (степени тяжести течення) по GOLD), перенесших ТВС легких и с достоверно более высоким уровнем остеопротегерина в индуцированной мокроті виявлена возможность ліпофлавоно-опосередованной корекції остеопротегерин-зависимого лейкоцито-опосередо-

ванного синтезу клітками бронхіального епітелію уровня провоспалительного цитокіну TNF- $\alpha$ .

Дано патофізіологічне обоснование целесообразности местного (інгаляції, ендобронхіальное введення) використання ліпофлавоно для корекції дисбалансу цитокінового гомеостазу на регіонарному (ткани бронхів) уровні у больних ХОЗЛ, перенесших ТВС легких и с повышенным уровнем остеопротегерина в индуцированной мокроті.

## Литература

1. Захарова П.Я. Эндотоксины – О-антигены кишечной палочки. – Киев: Наукова думка, 1980. – 207 с.
2. Тімченко О.Б. Клініко-імунологічне обґрунтування комплексної терапії обструктивних захворювань легень у хворих, котрі перенесли туберкульоз легень: автореф. дис... кандидата мед. наук: 14.01.27 - пульмонологія / О.Б. Тімченко. – Ялта, 2008. – 121 с.
3. Inhibition of anti-Tuberculosis T lymphocyte function with Tumor Necrosis Factor antagonists / H. Hamdi, X. Mariette, V. Godot [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2006. – Vol. 19, No. 8. – P. 114.
4. Osteoprotegerin in sputum is a potential biomarker in COPD / M. To, K. Ito, P.M. Ausin [et al.] // *CHEST.* – 2011. – Vol. 140, N. 1. – P. 76 – 83.
5. Tumor-necrosis-factor blockers: differential effects on mycobacterial immunity / O.Y. Saliu, C. Sofer, D.S. Stein [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 15, No. 194. – P. 486 – 492.
6. Westphal O. Bacterial endotoxins: chemical and clinical aspects / *Weinheim.* – 1984. – P. 1–10.

## Динаміка остеопротегерин-опосередкованого синтезу TNF- $\alpha$ клітинами епітелію бронхів під впливом ліпофлавоно у хворих на ХОЗЛ, котрі перенесли туберкульоз легень

Н.В. Обухова

У хворих з хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ), котрі перенесли туберкульоз (ТВС) легень, вивчені регіонарний (в індукованому мокротинні) рівень остеопротегерину, а також модулюючий вплив ліпофлавоно на остеопротегерин-опосередковану лімфоїдну (лейкоцитарну) регуляцію синтезу TNF- $\alpha$  клітинами епітелію бронхів.

Установлено, що у хворих з хозл і-іі стадії, перш за все – у хворих, котрі перенесли ТВС легень і з достовірно більш високим рівнем остеопротегерину в індукованому мокротинні виявлена можливість ліпофлавоно-опосередкованой корекції остеопротегерин-залежного лейкоцито-опосередкованого синтезу клітинами бронхіального епітелію рівня прозапального цитокіну TNF- $\alpha$ . Указані факти розцінюються як патофізіологічне обґрунтування доцільності місцевого (інгаляції, ендобронхіальне введення) використання у подібних хворих ліпофлавоно для корекції дисбалансу цитокінового гомеостазу на регіонарному (тканини бронхів) рівні.

Ключеві слова: остеопротегерин, TNF- $\alpha$ , бронхіальний епітелій, хронічне обструктивне захворювання легень, туберкульоз легень.

Dynamics of osteoprotegerin-mediated synthesis by TNF- $\alpha$  cells of bronchi epithelium under influence of lipoflavon in patients with chronic obstructive pulmonary disease, who had pulmonary tuberculosis

*N.V. Obuchova*

Regional level of osteoprotegerin (in the induced sputum) and also modulating influence of lipoflavon on osteoprotegerin-mediated lymphoid (leukocytic) regulation of synthesis by TNF- $\alpha$  cells of bronchi epithelium is studied in patients with chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), who had pulmonary tuberculosis (PT).

It is determined that in patients with COPD of the I-II stage, first of all – in patients, who had PT and with a higher level of osteoprotegerin in the induced sputum is revealed opportunity of lipoflavon-mediated correction of osteoprotegerin-dependent leukocytic-mediated synthesis by cells of bronchi epithelium of a level of proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ . Indicated facts are considered as pathophysiologic basing of expediency of local use (inhalations, endobronchial introduction) in such patients of lipoflavon for correction of imbalance of cytokine homeostasis on a regional level (tissues of bronchi).

Key words: osteoprotegerin, TNF- $\alpha$ , bronchial epithelium, chronic obstructive pulmonary diseases, pulmonary tuberculosis.