

УДК 616.24+616-002.5:615.3-08:611-018.74

© Коллектив авторов, 2012.

## ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ЭНДОТЕЛИЕМ ЛЕГОЧНЫХ СОСУДОВ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ХОЗЛ, ПЕРЕНЕСШИХ ТУБЕРКУЛЕЗ ЛЕГКИХ

**М.Н. Гришин, А.А. Хренов, О.Б. Тимченко, Л.И. Слобожан, В.М. Федосеева**

*Крымский республиканский клинический туберкулезный диспансер (г. Симферополь), кафедра фтизиатрии (зав. – проф. М.Н. Гришин), кафедра внутренней медицины № 3 (зав. – проф. А.А. Хренов), ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского»*

### CYTOKINE PRODUCTION BY LUNG VASCULAR ENDOTHELIUM *IN VITRO* IN PATIENTS WITH COPD AND LUNG TUBERCULOSIS IN ANAMNESIS

**M.N. Grishin, A.A. Khrenov, O.B. Tymchenko, L.I. Slobozhan, V.M. Fedosyeyeva**

#### SUMMARY

Lymphocyte-dependent cytokine production by lung vascular endothelium and its dynamic under the influence of lymphocytes after the incubation with lipopolysaccharides and reproductive hormones were studied. In patients with COPD and lung tuberculosis in anamnesis cytokine misbalance at the level of vascular wall with maximal expression in patients with hypogonadism was proved. The role of these changes in vascular remodeling in COPD progression is discussing.

### ПРОДУКЦІЯ ЦИТОКІНІВ ЕНДОТЕЛІЄМ ЛЕГЕНЕВИХ СУДИН *IN VITRO* У ХВОРИХ НА ХОЗЛ, ЩО ПЕРЕНЕСЛИ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНІВ

**М.Н. Гришин, А.А. Хренов, О.Б. Тимченко, Л.І. Слобожан, В.М. Федосєєва**

#### РЕЗЮМЕ

Вивчені лимфоцито-залежна продукція цитокінів ендотелієм судин і її зміна під впливом лімфоцитів, що інкубуються з ліпополісахаридами і репродуктивними гормонами. У хворих ХОЗЛ, що перенесли туберкульоз легенів, доведений розвиток цитокінового дисбалансу на рівні судинної стінки, максимально вираженого у осіб з гіпогонадізмом. Обговорюється роль цих змін у формуванні ремоделювання судин при прогресії ХОЗЛ.

**Ключевые слова:** хроническое обструктивное заболевание легких, туберкулез легких, тестостерон, хорионический гонадотропин, эндотелий.

В последнее два десятилетия при обсуждении патогенеза хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ) концепция приоритетного поражения эпителия сменилась новым научным подходом, отражающим важнейшую роль эмфиземы, сосудистых механизмов и провоспалительных цитокинов в развитии необратимой легочной недостаточности [2]. В частности, доказано, что пролиферативное рестриктивное поражение, развивающееся в прекапиллярном сегменте вызывает гипоксическую легочную гипертензию – важную патогенетическую составляющую ХОЗЛ [3]. Расстройства пролиферации сосудов при хронической гипоксии у больных ХОЗЛ ведут к гипоплазии сосудистого ложа с уменьшением диаметра сосудов и их общего количества [4]. Такое ограничение объема легочных сосудов сопровождается формированием порочного круга повреждения при стабилизации легочной гипертензии [5]. Обострению ХОЗЛ также сопутствует эндотелиальная дисфункция (нарушение функциональной активности сосудистого эндотелия), степень которой отражает тяжесть течения заболевания [1].

Основной целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и

оценка клинической эффективности применения гормонов репродуктивной сферы для коррекции цитокинового гомеостаза в комплексном лечении ХОЗЛ у лиц, перенесших ТВС легких. В настоящей работе нами представлены результаты изучения влияния половых стероидов на продукцию цитокинами (включая липополисахарид-индуцированную) клеток эндотелия сосудов легких у больных ХОЗЛ, перенесших туберкулез (ТВС) легких.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 1-ю группу вошли 29 пациентов, страдающих ХОЗЛ (I-II степени тяжести) без ТВС в анамнезе, во 2-ю группу – 29 больных ХОЗЛ (I-II степени тяжести), перенесших различные формы ТВС легких. В качестве экспериментальной модели нами были выбраны клетки эндотелия сосудов легких «условно здоровых» лиц (контрольная группа), образцы которых получали *intra operationem* при проведении оперативных вмешательств (резекция туберкуломы, кисты легкого и др. в пределах здоровых тканей); образцы сосудов получены из участков резецируемой здоровой ткани у 29 больных в отделении торакальной хирургии Симферопольского городского клинического туберкулезного диспансера). Клинически все лица

контрольной группы не имели признаков декомпенсированной соматической патологии, гематологических, аутоиммунных заболеваний, а также существенных лабораторных сдвигов. При оценке уровня тестостерона в плазме крови контролем также служили 28 здоровых доноров в соответствующем возрастном диапазоне.

Учитывая, что клетки эндотелия получали в основном из микроциркуляторного русла образцов тканей легких, полученных *intra operationem*, нами использована методика выделения эндотелиальных клеток Ryan U.S., Ryan J.W. (1980) [7]. Эндотелиальные клетки в монослойной культуре культивировали по методу Patel J., Block E. (1993) в течение 2-х суток [6]. Все монослои вначале идентифицировались как эндотелиальные клетки с помощью микроскопии. С эндотелиальными клетками легочных сосудов лиц контрольной группы параллельно проводились несколько экспериментов, включая культивацию с введением взвеси мононуклеаров больных 1-й и 2-й групп, а также введением взвеси мононуклеаров после преинкубации клеток с 6,0 нг/мл человеческого тестостерона (химической компании SIGMA, США, для растворения жирорастворимого полового стероида использовался ацетон с его последующим полным испарением), 12,0 ЕД/мл раствора хорионического гонадотропина и 20 мкг/мл липополисахарида

(ЛПС грамотрицательной энтеробактерии *Escherichia coli* K30 (O9:K30:H12), «Seriva», Германия).

Концентрацию цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-4  $\beta$  в культуральной среде определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов ООО «Цитокины». Оценка результатов осуществляется фотометрически. Определение содержания тестостерона в плазме крови осуществлялось с помощью набора «Testosterone EIA COBAS CORE» методом иммуноферментного анализа.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами установлено, что в 1-й группе больных уровень тестостерона в плазме крови существенно не отличается от соответствующего показателя у здоровых лиц. Во 2-й группе больных уровень тестостерона в плазме крови снижен до  $4,29 \pm 0,27$  нг/мл, что статистически значимо ниже ( $p < 0,001$ ) в сравнении со здоровыми лицами мужского пола соответствующего возрастного диапазона, у которых уровень полового стероида составляет  $6,82 \pm 0,23$  нг/мл.

Результаты проведенных нами экспериментов *in vitro*, документирующих влияние ЛПС (ЭТ), тестостерона и хорионического гонадотропина на лейкоцитарную (лимфоидную) регуляцию (использованы мононуклеары больных 1-й и 2-й групп) уровня IL-1 $\beta$  в культуральной среде культуры эндотелиальных клеток сосудов лиц контрольной группы представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Влияние преинкубации мононуклеаров больных 1-й и 2-й групп с ЛПС, тестостероном и хорионическим гонадотропином на лимфоидную регуляцию уровня IL-1 $\beta$  в культуральной среде культуры эндотелиальных клеток сосудов лиц контрольной группы. пг/мл**

Этапы эксперимента	Стат. показ.	IL-1 $\beta$	
		В краткосрочную культуру клеток эндотелия вводится суспензия мононуклеаров больных 1-й группы	В краткосрочную культуру клеток эндотелия вводится суспензия мононуклеаров больных 2-й группы
Опыт 1 (без введения мононуклеаров)	M $\pm$ m n	17,40 $\pm$ 0,94 29	
Опыт 2 + мононуклеары $\rightarrow$ в культуральную среду перед началом культивирования	M $\pm$ m n p	19,23 $\pm$ 0,77 29 < 0,2	24,09 $\pm$ 1,29 29 < 0,001
Опыт 3 + ЛПС $\rightarrow$ мононуклеары $\rightarrow$ в культуральную среду перед началом культивирования	M $\pm$ m n p p <sub>1</sub>	23,29 $\pm$ 1,05 29 < 0,001 < 0,01	28,81 $\pm$ 1,18 29 < 0,001 < 0,01
Опыт 4 + тестостерон $\rightarrow$ мононуклеары $\rightarrow$ в культуральную среду перед началом культивирования	M $\pm$ m n p p <sub>1</sub>	15,24 $\pm$ 1,14 29 < 0,2 < 0,01	20,75 $\pm$ 1,21 29 < 0,05 < 0,1
Опыт 5 + гонадотропин $\rightarrow$ мононуклеары $\rightarrow$ в культуральную среду перед началом культивирования	M $\pm$ m n p p <sub>1</sub>	16,79 $\pm$ 1,23 29 > 0,5 < 0,1	17,34 $\pm$ 1,09 29 > 0,5 < 0,001

Примечание: p – достоверность различий, высчитанная в сравнении с экспериментом 1,

p<sub>1</sub> – достоверность различий, высчитанная в сравнении с экспериментом 2 в той же группе больных.

Как видно из табл. 1, введение взвеси мононуклеарных лейкоцитов больных 1-й группы в культуру клеток сосудистого эндотелия условно здоровых лиц не оказывает существенного влияния на уровень провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в культуральной среде. В эксперимента с мононуклеарами больных 2-й группы исследованный показатель возрастает на 38,4 % ( $p < 0,001$ ). Преинкубация мононуклеаров с ЛПС с последующим введением клеток в культуру эндотелиоцитов характеризуется резким повышением исследованного показателя: в эксперименте 2 уровень IL-1 $\beta$  возрастает в эксперименте с мононуклеарами больных 1-й группы на 21,1 % ( $p_1 < 0,01$ ), больных 2-й группы – на 19,6 % ( $p_1 < 0,01$ ).

В культуральных биологических моделях с преинкубацией мононуклеаров с тестостероном и плацентарным гормоном (опыты 4 и 5) выявлено статис-

тически значимое модулирующее (ингибирующее) влияние половых гормонов на лимфоидную регуляцию функциональной активности (синтез цитокина IL-1 $\beta$ ) эндотелиальных клеток – тестостерона у больных 1-й группы и плацентарного гормона у больных 2-й группы. Эти факты свидетельствуют о существовании системы прямой (непосредственной) гормоно-опосредованной лимфоцито-зависимой ингибции синтеза провоспалительных цитокинов (либо стимуляции синтеза антицитокиновых субстанций) клетками сосудистого эндотелия.

Результаты проведенных нами экспериментов *in vitro*, документирующих влияние ЭТ, тестостерона и хорионического гонадотропина на лимфоидную регуляцию уровня IL-4  $\beta$  культуральной среде культуры эндотелиальных клеток сосудов представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Влияние преинкубации мононуклеаров больных 1-й и 2-й групп с ЛПС, тестостероном и хорионическим гонадотропином на лимфоидную регуляцию уровня IL-4 в культуральной среде культуры эндотелиальных клеток сосудов лиц контрольной группы, пг/мл**

Этапы эксперимента	Стат. показ.	IL-4	
		В краткосрочную культуру клеток эндотелия вводится суспензия мононуклеаров больных 1-й группы	В краткосрочную культуру клеток эндотелия вводится суспензия мононуклеаров больных 2-й группы
Опыт 1 (без введения мононуклеаров)	M $\pm$ m n	3,27 $\pm$ 0,19 24	
Опыт 2 + мононуклеары	M $\pm$ m n p	4,16 $\pm$ 0,19 24 < 0,001	6,47 $\pm$ 0,24 24 < 0,001
Опыт 3 + ЛПС $\rightarrow$ мононуклеары	M $\pm$ m n p p <sub>1</sub>	6,16 $\pm$ 0,26 24 < 0,001 < 0,001	9,40 $\pm$ 0,33 24 < 0,001 < 0,001
Опыт 4 + тестостерон $\rightarrow$ мононуклеары	M $\pm$ m n p p <sub>1</sub>	3,20 $\pm$ 0,16 24 > 0,5 < 0,001	4,67 $\pm$ 0,41 24 < 0,01 < 0,001
Опыт 5 + гонадотропин $\rightarrow$ мононуклеары	M $\pm$ m n p p <sub>1</sub>	3,17 $\pm$ 0,22 24 > 0,5 < 0,001	5,61 $\pm$ 0,27 24 < 0,001 < 0,02

Примечание: p – достоверность различий, высчитанная в сравнении с экспериментом 1, p<sub>1</sub> – достоверность различий, высчитанная в сравнении с экспериментом 2 в той же группе больных.

Анализ цифрового материала, представленного в табл. 2, свидетельствует, что введение взвеси мононуклеаров (эксперимент 2) больных 1-й группы приводит к возрастанию в культуральной среде уровня IL-4 на 27,2 % ( $p < 0,001$ ); под влиянием же суспензии лейкоцитов больных 2-й группы исследованный показатель возрастает на 97,9 % ( $p < 0,001$ ). В эксперименте с мононуклеарами больных 1-й группы выявлено также, что преинкубация клеток с тестостероном и плацентарным гормоном (опыты 4 и 5) спо-

собствует отмене лимфоидной стимуляции синтеза IL-4 эндотелиоцитами сосудов, а ЛПС-стимулированные мононуклеары повышают свое иммуноактивное влияние – в эксперименте 3 исследованный показатель возрастает на 48,1 % ( $p_1 < 0,001$ ).

У больных 2-й группы под влиянием ЛПС-стимула мононуклеарные лейкоциты резко стимулируют синтез эндотелиоцитами цитокина (в 1,5 раза,  $p_1 < 0,001$ ), а под влиянием преинкубации клеток с тестостероном и плацентарным гормоном – статис-

тически значимо снижают уровень IL-4 в культуральной среде.

Таким образом, анализ представленных научных фактов, документирующих лимфоцито-зависимую цитокинпродуцирующую активность эндотелиальных клеток сосудов, а также динамику исследованных показателей под влиянием преинкубации лимфоцитов с ЛПС и половыми гормонами, расценивается нами как подтверждение наличия у больных ХОЗЛ цитокинового дисбаланса на уровне сосудистой стенки, максимально выраженные у больных с фоновым гипогонадизмом. Последнее, по нашему мнению, может быть расценено как важное звено патогенеза ремоделирования сосудов и, как следствие, формирование патогенетического «базиса» хронизации и рецидивирования заболевания.

#### ВЫВОДЫ

1. Течение ХОЗЛ характеризуется нарушением лимфоидной регуляции функциональной (синтез цитокинов) активности эндотелиальных клеток сосудов легких, наиболее выраженным у лиц после перенесенного ТВС легких и с дефицитом синтеза эндогенного тестостерона.

2. У больных ХОЗЛ с гипогонадизмом дано патофизиологическое обоснование целесообразности использования заместительной терапии препаратами тестостерона, а также хорионического гонадотропина для коррекции функциональной (цитокноп-

родуцирующей) активности эндотелиальных клеток сосудов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кулинич О.В. Особливості функціонального стану судинного ендотелію у хворих на хронічний обструктивний бронхіт в залежності від стадії захворювання // Укр. пульмонологічний журнал. – 2003. – №2. – С.232-233.
2. Чучалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких. – М.: ЗАО «Из-во БИНОМ», СПб.: Невский Диалект, 1998. – 512 с.
3. Cofteky J., Reid L., Evans I.N. Mechanical properties and structure of isolated pulmonary arteries remodeled by chronic hypoxia // Am. Rev. Resp. Dis. – 2000. – Vol.136. – P. 388–394.
4. Fried R., Reid L. Early recovery from hypoxic pulmonary hypertension: a structural and functional study // J. Appl. Physiol. – 1996. – Vol.57. – P. 1247-1253.
5. Jones R., Reid L. Structural basis of pulmonary hypertension // Current Pulmonology. – Chicago: D. Simmons Year Book Med. Publishers, 1997. – P. 175-210.
6. Patel J.M., Block E.R. Acrolein-induced injury to cultured pulmonary artery endothelial cells // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1993. – Vol.122. – P. 46-53.
7. Ryan U.S., Ryan J.W. Angiotensin-converting enzyme: II. Pulmonary endothelial cells in culture // Environ. Health. Perspect. – 1980. – Vol.35. – P. 171-180.