

УДК: 616.24.5+616-85

Динамика остеопротегерин–опосредованного синтеза TNF-α 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-α, 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 (ТБС) 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 ТБС (или со скрытым ТБС), как указывают Hamdi H. и соавт. (2006) [3], Saliu O. и соавт. (2006) [5] вскрыли главное осложнение анти-TNF-терапии – реактивацию скрытой ТБС 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-γ [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 ТБС 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-α 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 ТБС 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-α были использованы тест-системы и реагенты тест-

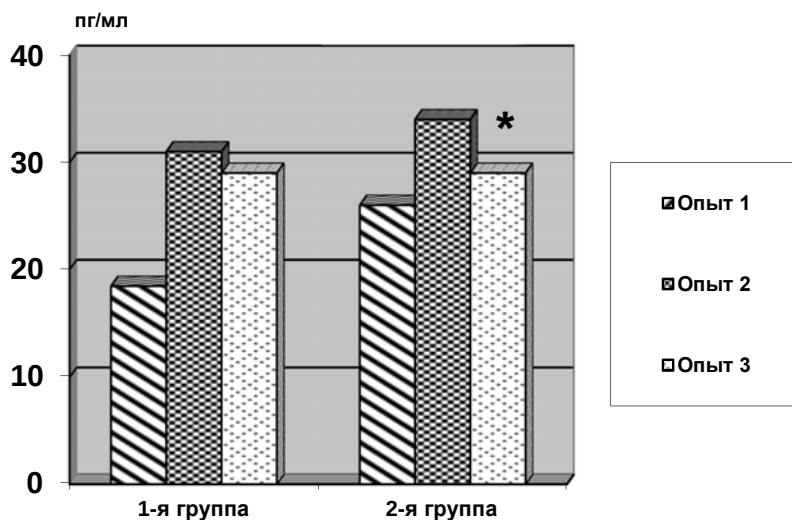
системы ProCon НПО «Протеиновый контур» (Россия).

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 регионального (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 ТБС 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-α клетками эпителия бронхов у больных 1-й и 2-й групп

TNF- α в супернатанте культуральної середовища культури кліток бронхіального епітелію у больових 2-ї групи (в опиті 2) статистично значимо вище, чим у больових 1-ї групи. В опиті 2 дослідований показатель у больових як 1-ї, так і 2-ї груп суттєво зростає (в порівнянні з опитом 2) відповідно на 75,6% і 43,9% ($p < 0,001$), що документує наявність у больових ХОЗЛ остеопротегерин-залежного моноклеаро-опосередкованого механізму синтезу TNF- α клітками епітелію бронхів. В опиті 3 виявлено, що інкубація кліток з ліпофлавоном частково «отримує» інгібувальний вплив остеопротегерину на синтез провоспалительного цитокіну TNF- α клітками епітелію бронхів тільки у больових 2-ї групи: в порівнянні з опитом 2 дослідований показатель зменшується на 15,6% ($p < 0,01$).

Висновки

У больових ХОЗЛ (ХОЗЛ I-II стадії (ступені тяжкості течення) по GOLD), перенесли ТБС легких і з достовірно більш високим рівнем остеопротегерину в індукційованій мокроті виявлена можливість ліпофлавоно-опосередкованої корекції остеопротегерин-залежного лейкоцито-опосеред-

ваного синтезу клітками бронхіального епітелію рівня провоспалительного цитокіну TNF- α .

Дано патофізіологічне обґрунтування цілеспрямованості місцевого (інгаляції, ендобронхіальне введення) використання ліпофлавоно для корекції дисбалансу цитокінового гомеостазу на регіонарному (тканини бронхів) рівні у больових ХОЗЛ, перенесли ТБС легких і з підвищеним рівнем остеопротегерину в індукційованій мокроті.

Література

1. Захарова П.Я. Ендотоксини – О-антигени кишечної палички. – Київ: Наукова думка, 1980. – 207 с.
2. Тіщенко 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. Тіщенко. – 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. Salii, 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- α 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 (ТБС) легень, вивчені регіонарний (в індукційованій мокротинні) рівень остеопротегерину, а також модулюючий вплив ліпофлавоно на остеопротегерин-опосередковану лімфоїдну (лейкоцитарну) регуляцію синтезу TNF- α клітинами епітелію бронхів.

Установлено, що у хворих з хозл і-іі стадії, перш за все – у хворих, котрі перенесли ТБС легень і з достовірно більш високим рівнем остеопротегерину в індукційованій мокротині виявлена можливість ліпофлавоно-опосередкованої корекції остеопротегерин-залежного лейкоцито-опосередкованого синтезу клітинами бронхіального епітелію рівня прозапального цитокіну TNF- α . 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- α , бронхіальний епітелій, хронічне обструктивне захворювання легень, туберкульоз легень.

Dynamics of osteoprotegerin-mediated synthesis by TNF- α 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- α 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- α . 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- α , bronchial epithelium, chronic obstructive pulmonary diseases, pulmonary tuberculosis.