

Н.П. Котлукова¹, О.И. Артеменко¹, М.П. Давыдова²,
О.Н. Архангельская³, Л.А. Курбатова⁴

УЧАСТИЕ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКАХ СЕРДЦА

¹ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава», ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, ³ПКЦ ГКБ № 67, ⁴ДКБ № 13 им. Н.Ф. Филатова, Москва

Одним из современных направлений в изучении патогенеза различных заболеваний сердечно-сосудистой системы является исследование роли цитокинов. Целью работы было изучение роли провоспалительных цитокинов в развитии легочной гипертензии (ЛГ) при врожденных пороках сердца (ВПС) у детей раннего возраста. Определяли экспрессию мРНК фактора некроза опухоли α (TNF α), интерлейкинов 1 и 6 (IL1, IL6) в лимфоцитарно-моноцитарной фракции клеток крови методом обратной транскрипции и ПЦР. У пациентов с ВПС и ЛГ было обнаружено увеличение экспрессии IL1 и TNF α в лимфоцитах и моноцитах крови по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Уровни экспрессии IL1 и TNF α коррелировали между собой ($k = 0,77$). Пациенты с синдромом Дауна отличались низкой экспрессией провоспалительных цитокинов как в группе с ЛГ, так и в группе сравнения. Таким образом, провоспалительные цитокины участвуют в формировании ЛГ и сердечной недостаточности при ВПС на ранних стадиях заболевания, что свидетельствует об их значимости в ремоделировании легочного сосудистого русла и миокарда.

Ключевые слова: дети 1-го года жизни, врожденные пороки сердца, легочная гипертензия, синдром Дауна, провоспалительные цитокины.

Study of cytokines role in pathogenesis of different diseases is one of the main current trends. The aim of present study was to investigate role of pro-inflammatory cytokines in development of pulmonary hypertension (PH) in cases of congenital heart diseases (CHD). Expression of tumor necrosis factor (TNF α) mRNA, interleukins 1 and 6 (IL1, IL6) and lymphocytic- monocytic fraction of blood cells were investigated

Контактная информация:

Котлукова Наталья Павловна – д.м.н., проф. каф. детских болезней № 2 ГОУ ВПО РГМУ

Адрес: 117997 г. Москва, ул. Островитянова, 1

Тел.: (499) 199-65-71, E-mail: natalil30@yandex.ru

Статья поступила 14.10.09, принята к печати 20.01.10.

by methods of reverse transcription and polymerase chain reaction in children with CHD in first year of life. Expression of IL1 and IL6 was significantly increased in patients with HCD in comparison with control ($p < 0,05$). Levels of IL1 and $TNF\alpha$ had positive correlation ($k=0,77$). Patients with Down syndrome had low expression of pro-inflammatory cytokines both in group with LG, and in control group. So, pro-inflammatory cytokines take part in PH and cardiac insufficiency forming in early stage of CHD, and these data prove their importance in process of remodeling in pulmonary vessels and in myocardium.

Key words: infants in 1st year of life, congenital heart disease, pulmonary hypertension, Down syndrome, pro-inflammatory cytokines.

В настоящее время не вызывает сомнения, что воспаление играет важную роль при некоторых видах легочной гипертензии (ЛГ) у людей, к примеру, при заболеваниях соединительной ткани [1, 2]. Примечательно, что некоторым пациентам, страдающим тяжелой артериальной ЛГ, связанной с системной красной волчанкой, помогает иммуносупрессивная терапия, что подчеркивает значимость процесса воспаления у данной группы. Пациенты с идиопатической и вторичной ЛГ на фоне врожденных пороков сердца (ВПС) также имеют ряд иммунологических нарушений, свидетельствующих в поддержку возможной роли воспаления в патогенезе этого заболевания [3, 4].

Британскими учеными опубликовано исследование, проведенное на больших группах взрослых пациентов с синдромом Эйзенменгера, в том числе при синдроме Дауна (СД), в котором определялись различные провоспалительные факторы и маркеры эндотелиальной дисфункции в крови. Концентрация медиаторов воспаления (интерлейкин 6 – IL6, фактор некроза опухоли α – $TNF\alpha$, MCP-1) и С-реактивный белок в плазме при синдроме Эйзенменгера была значительно выше, чем в контроле с наибольшими цифрами при СД, что свидетельствует об участии воспаления в развитии ЛГ. По литературным данным, при СД синдром Эйзенменгера прогрессирует быстрее, и пациенты имеют худшую выживаемость [3].

У пациентов с ЛГ в ткани легких обнаруживают периваскулярные воспалительные инфильтраты, состоящие преимущественно из лимфоцитов и макрофагов. Эти морфологические изменения характерны для более поздних стадий заболевания. Наиболее вероятным сигналом для привлечения циркулирующих иммунных клеток в легочную ткань служит повреждение эндотелия. Высказывается гипотеза, что макрофагально-лимфоцитарные инфильтраты при ЛГ и ВПС индуцируют пролиферацию интимы и патологический ангиогенез, что ведет к необратимым изменениям легочного сосудистого русла [4].

Среди множества цитокинов на участие в патогенезе ЛГ претендуют IL1, IL6, $TNF\alpha$, TGF β , хемокины и другие медиаторы воспаления, синтезируемые эндотелием, гладкомышечными клетками, фибробластами и периваскулярными лимфоцитарно-макрофагальными инфильтратами в легочной ткани. Большинство клинических исследований

ЛГ при ВПС проведено на взрослых группах пациентов с поздними стадиями заболевания [1–7]. Является ли нарастание провоспалительных факторов в крови и легочной ткани у людей, страдающих ЛГ, пусковым моментом для перестройки легочных сосудов или следствием наложения инфекционных осложнений – в настоящее время не ясно.

Наше исследование посвящено изучению роли воспаления в патогенезе гиперводемической ЛГ при ВПС у детей раннего возраста.

Мы планировали определить, насколько рано при ВПС с обогащением малого круга кровообращения (МКК) и формированием ЛГ в процесс вовлекаются провоспалительные цитокины, и сопоставить их уровень со степенью гемодинамических нарушений, для чего измеряли экспрессию мРНК IL1, IL6 и $TNF\alpha$ в лимфоцитах крови у грудных детей.

Материалы и методы исследования

Набор пациентов проводили на базе ПКЦ ГКБ № 67 и ДКБ № 13 им. Н.Ф. Филатова г. Москвы. Под нашим наблюдением находились 49 детей в возрасте от 1 до 16 месяцев. Основную группу составили пациенты с ВПС и повышением давления в легочной артерии (17 детей), без синдромальной патологии. Критериями исключения являлись острые и хронические инфекционные заболевания, пороки развития легких, декомпенсированные соматические заболевания и алергодерматозы в стадии обострения. В исследование не включали детей, перенесших кардиохирургическую коррекцию ВПС. В отдельную группу были выделены дети с ВПС и ЛГ в сочетании с СД (7 пациентов), так как известно, что эта категория детей наиболее рано развивает высокую необратимую ЛГ. Для анализа данных были набраны 3 группы сравнения пациентов аналогичного возраста: 1) практически здоровые дети (13 пациентов); 2) дети с СД без кардиологической патологии (6 пациентов); 3) дети с ВПС и гиповодемией МКК (6 пациентов).

Для уточнения диагноза всем пациентам было проведено общеклиническое (выяснение данных анамнеза, осмотр, общие анализы крови и мочи) и кардиологическое обследование, которое включало ЭКГ, ДЭХОКГ, рентгенографию грудной клетки, измерение сатурации. Клиническая характеристика групп представлена в табл. 1.

Лабораторная часть работы проводилась на факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

Таблица 1

Клиническая характеристика наблюдаемых больных

Группы детей	ВПС	Возраст, мес	Количество пациентов	Примечание
ВПС + гипертрофия МКК и ЛГ	ДМЖП, ДМПП, ОАП, ДОС от ПЖ в сочетании с ДМЖП	5,4±4,8 (1-7)	17 (12/5)	Систолическое давление в ПЖ 22-130 мм Нг
ВПС + гиповолемия МКК	СЛА, ТФ, ДОС от ПЖ в сочетании с ДМЖП и СЛА, СЛА в сочетании с множественными ДМЖП	4,2±3,3 (1-10)	6 (3/3)	Градиент давления на ЛА 45-82 мм Нг
СД + ВПС + гипертрофия МКК и ЛГ	АВК, ДМЖП, ДМПП	5,6±4,4 (1-12)	7 (3/4)	Систолическое давление в ПЖ 20-105 мм Нг
СД без ВПС	МАРС, ОО	2,5±2,9 (1-8)	6 (3/3)	-
Контрольная группа	МАРС, ОО	5,4±4,8 (1-16)	13 (8/5)	-

АВК – атриовентрикулярный канал, ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки, ДМПП – дефект межпредсердной перегородки, ДОС – двойное отхождение сосудов, МАРС – малая аномалия развития сердца, МКК – малый круг кровообращения, ОАП – открытый артериальный проток, ОО – открытое овальное окно, ПЖ – правый желудочек сердца, СЛА – стеноз легочной артерии, ТФ – тетрада Фалло.

Для анализа экспрессии мРНК цитокинов проводили забор 1 мл венозной крови. Мононуклеарные клетки и лимфоциты периферической крови выделяли непосредственно после ее забора центрифугированием (при 24 °С и 1500 g в течение 15 мин) в градиенте плотности Ficoll-Paque (1,077 г/см³), в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Отбирали обогащенную лимфоцитами и моноцитами интерфазу, добавляли эквивалент тканевой среды RPMI и осаждали клетки центрифугированием в течение 15 мин при температуре 24 °С и 400 g.

Выделение РНК проводили с помощью фенольно-хлороформного метода с использованием TRI-реагента (Sigma). После гомогенизации при добавлении 500 мкл TRI-реагента образцы перемешивали с 150 мкл хлороформа и проводили разделение фаз центрифугированием (12 000 g в течение 20 мин при 4 °С). РНК из водной фазы осаждали добавлением эквивалента изопропилового спирта и последующим центрифугированием при 14 000 g в течение 30 мин при 4 °С. Осадок РНК промывали дважды 75% раствором этанола и растворяли в 25 мкл деионизированной воды, обработанной диэтилпирикарбонатом и содержащей 2 ед. активности ингибитора РНКазы (Sintol). Относительную концентрацию РНК оценивали электрофоретически.

Для удаления примеси ДНК образцы, содержащие 1-2 мкг РНК и 1 ед. активности ингибитора РНКазы, инкубировали в течение 40 мин при 37 °С с 2 ед. активности ДНКазы I, не обладающей РНКазной активностью (Fermentas). После инкубации инактивировали ДНКазу стоп-реагентом (Fermentas). Качество ДНК-азной обработки отслеживали по результатам ПЦР для β-актина.

Обратную транскрипцию мРНК проводили в течение 1,5 ч при 38 °С в образцах, содержащих на 0,5-1 мкг

обработанной ДНКазой РНК 100 ед. активности обратной транскриптазы MMuLV (Fermentas), 1 ед. активности ингибитора РНКазы, 0,1 мкг олиго(18)-dT праймеров (Sintol), 60 pM гексарандом праймеров (Sintol), 400 мкМ дезоксинуклеотидилтрифосфатов (Sigma).

В пробирки с кДНК вносили 0,13 мМ дезоксинуклеотидилтрифосфатов, 4 рмоль специфичных праймеров и 0,5 ед. активности Taq-полимеразы (Fermentas) в 1-кратном буфере для полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР проводили с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-технология», Россия) в течение 39 (для β-актина) или 42 циклов (IL1β, IL6, TNFα) при параметрах: 95 °С – 15 с, 60 °С (для β-актина, IL1β, TNFα) или 62 °С (для IL6) – 20 с, 72 °С – 30 с.

Были использованы следующие пары праймеров [8]: для β-актина – 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGAC, 5'-TCGGCCGTGGTGGTGAAGC, для IL1β – 5'-CTCCTCA CCCACACCATCAGCCGC, 5'-GAAGGTTGGATGTTCTCGTCC TCCACT, для TNFα – 5'-CAGAGAGTCTGTGCTGAATG TGGA, 5'-AGAGGAGGGTTTCTTAGAACCAA, для IL6 – 5'-GATTCCAAAGATGTAGCCGCCACAA, 5'-CATTTGTG GTTGGGTCAGGGGTGGT.

Результаты ПЦР анализировали электрофоретически, используя 2% агарозный гель. Производили фотосъемку геля в ультрафиолете на цифровую камеру «Kodak DC 290 Zoom», с обработкой полученного изображения программой «KODAK 1D Image Analysis Software» («Kodak», США). Результатом явилась относительная яркость полос ампликонов, выраженная в условных единицах, сравниваемая с яркостью продуктов ПЦР положительного контроля (кДНК стимулированных лимфоцитов). Количественный анализ проводили на основании калибровочных кривых, полученных по результатам амплификации растворов контрольной кДНК после последовательных 10-кратных разведений.

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета программ SPSS 15.0. Данные представлены в виде медианы с указанием минимального и максимального значений. Оценку различий между группами проводили при помощи непараметрических методов. Степень связи между признаками оценивали, вычисляя коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Значения $p < 0,05$ считали значимыми.

Результаты и их обсуждение

У пациентов с ВПС и лево-правым шунтом было обнаружено увеличение экспрессии IL1 и TNF α в лимфоцитах по сравнению с контролем (табл. 2, рисунок) и их уровни коррелировали между собой ($k=0,77$). Примечательно, что у здоровых детей зависимость уровней экспрессии этих цитокинов между собой отсутствовала. В клиническом анализе крови признаков воспаления ни в одной группе не отмечали и на рентгенограммах грудной клетки инфильтративных или очаговых изменений в легких обнаружено не было. Наши данные совпадают с литературными, в которых продемонстрирована активация провоспалительных цитокинов (IL1, IL6, TNF α , хемокинов) при ЛГ в более старших возрастных группах [1–3]. Синтезируются они иммунными клетками в периферической крови и лимфоцитарно-моноцитарными бронховаскулярными инфильтратами в легких, а также эндотелиальными клетками [5]. Предполагают различные пути влияния провоспалительных факторов на легочное сосудистое русло. В культуре легочных артериальных гладкомышечных клеток показано увеличение экспрессии циклооксигеназы 2-го типа под воздействием IL1 β , IL6, TGF β_1 , что приводит к гиперпродукции PGE $_2$ – одного из основных легочных вазоконстрикторов – и угнетению синтеза простаглицина [9, 10]. Провоспалительные цитокины стимулируют образование свободных радикалов. Известно, что IL6 и TNF α оказывают негативное влияние на количество и функции

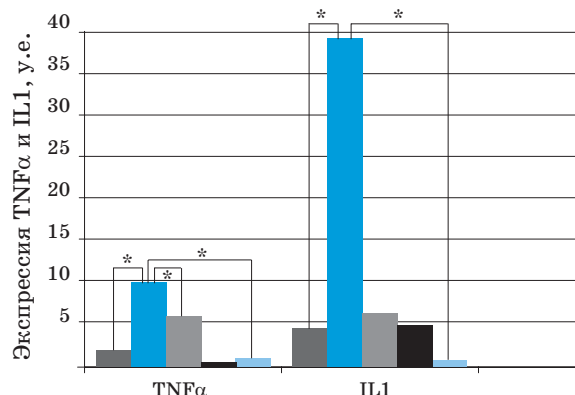


Рисунок. Экспрессия провоспалительных цитокинов в лимфоцитарно-моноцитарной фракции крови.

* $p < 0,05$; 1-й столбик – контроль, 2-й столбик – ВПС+ЛГ, 3-й столбик – ВПС+гиперволемия МКК, 4-й столбик – СД, 5-й столбик – СД+ЛГ.

Таблица 2

Экспрессия провоспалительных цитокинов в лимфоцитарно-моноцитарной фракции крови

Группы детей	n	TNF α	IL1
Контрольная	13	1,4 (0,3–43,7)	3,1 (0–87,3)
ВПС+ гиперволемия МКК, ЛГ	17	8,7 * (0–390,5)	37,5 * (0,1–933,8)
НК 0–I	4	3,6 (0–104,2)	24,3 (5,7–665,0)
НК IIА	7	22,8 (2,0–390,6)	256,8 (4,9–933,8)
НК IIА–Б	6	9,0 (0–220,7)	14,9 (0,1–119,1)
ВПС+ гиповолемия МКК	6	5,8 ** (0,2–24,2)	4,4 (0–319,1)
СД, контроль	6	0,6 (0,4–0,7)	3,6 (2,6–7,7)
СД+ВПС+ гиперволемия МКК, ЛГ	7	0,9 ** (0,3–1,1)	0,5 ** (0,4–5,0)

Данные представлены в виде медианы в условных единицах, в скобках указаны минимальное и максимальное значение в каждой группе; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** $p < 0,05$ по сравнению с группой «ВПС+ЛГ».

предшественников эндотелиальных клеток, которые мобилизуются из костного мозга и участвуют в постнатальном васкулогенезе [3]. По данным последних исследований, болюсное введение эндотелиальных клеток-предшественников приводит к регрессу ЛГ у пациентов с первичной ЛГ [11].

Провоспалительные цитокины оказывают неблагоприятное влияние на функции миокарда [6]. Динамика экспрессии IL1 и TNF α при нарастании степени НК выглядит неоднозначно (табл. 2). Наибольший уровень экспрессии обоих цитокинов получен у детей с НК IIА, а при утяжелении НК наблюдается снижение их экспрессии в лимфоцитах, хотя она по-прежнему остается выше, чем в группе сравнения. Объяснением этого явления, возможно, служит тот факт, что 3 из 8 детей в группе НК IIА–Б получали глюкокортикоиды (преднизолон), обладающие мощным противовоспалительным действием.

Закономерным представляется тот факт, что у пациентов с ВПС и гиповолемией МКК не обнаружено усиления экспрессии провоспалительных цитокинов в мононуклеарах крови. Это обусловлено, во-первых, значительно меньшим «страданием» миокарда при этих ВПС и «сохранностью» легочного сосудистого русла.

Нами не выявлено экспрессии IL6 в лимфоцитарно-моноцитарной фракции крови во всех группах. Однако, по литературным данным, при ЛГ и синдроме Эйзенменгера показано нарастание

этого цитокина в крови и легких в более старших возрастных группах [2, 3]. Можно предположить, что экспрессия IL6 увеличивается на более поздних стадиях заболевания и является особенностью детей первого года жизни.

Низкая экспрессия провоспалительных цитокинов при ЛГ у детей с ВПС и СД, вероятно, связана с относительным иммунодефицитным состоянием, что свойственно пациентам с этой патологией [12]. Ранее нами было показано отсутствие активации антиоксидантной системы в ответ на усиление окислительного стресса при развитии

ЛГ у пациентов с СД [13]. В совокупности эти особенности могут отвечать за быстрое прогрессирование ЛГ при данном синдроме.

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что провоспалительные цитокины участвуют в формировании ЛГ и сердечной недостаточности при ВПС с лево-правым шунтом на ранних стадиях заболевания (первый год жизни ребенка), что свидетельствует об их значимости в ремоделировании легочного сосудистого русла и миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. PNAS, 2007; 104 (27): 11418–11423.
2. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. Eur. Respir. J. 2003; 22: 358–363.
3. Diller GP, van Eijl S, Okonko DO et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients With Eisenmenger Syndrome and Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. Circulation. 2008; 117: 3020–3030.
4. Levy M, Maurey C, Celermajer DS et al. Impaired Apoptosis of Pulmonary Endothelial Cells Is Associated With Intimal Proliferation and Irreversibility of Pulmonary Hypertension in Congenital Heart Disease. J. Am. Coll. Cardiol. 2007; 49: 803–810.
5. Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 111: S460–475.
6. Kelly RA, Smith TW. Cytokines and cardiac contractile function. Circulation. 1997; 95: 778–781.
7. Qing M, Schumacher K, Heise R et al. Intramyocardial Synthesis of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Infants With Congenital Cardiac Defects. JACC. 2003; 41 (12): 2266–2274.
8. Жданов А.В., Сосулина Л.Ю., Курбанова Д.Ф. и др. Экспрессия генов цитокинов в мононуклеарных клетках крови у женщин с воспалительными заболеваниями придатков матки. Бюл. exper. биол. 2002; 134 (11): 555–559.
9. Bradbury J, Newton R, Zhu YM et al. Effect of bradykinin, TGFβ₁, IL1β, and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2002; 283: 717.
10. Itoh A, Nishihira J, Makita H et al. Effects of IL-1beta, TNF-alpha, and macrophage migration inhibitory factor on prostacyclin synthesis in rat pulmonary artery smooth muscle cells. Respirology. 2003; 8 (4): 467–472.
11. Wang XX, Zhang FR, Shang YP et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. J. Am. Coll. Cardiol. 2007; 49: 1566–1571.
12. Goldacre MJ, Wotton CJ, Seagroatt V, Yeates D. Cancers and immune related diseases associated with Down's syndrome: a record linkage study. Arch. Dis. Child. 2004; 89: 1014–1017.
13. Котлукова Н.П., Артеменко О.И., Давыдова М.П. и др. Роль окислительного стресса и антиоксидантной системы в патогенезе врожденных пороков сердца. Педиатрия. 2009; 87 (1): 24–28.