

УДК 616.37- 002-036.11

UDC 616.37- 002-036.11

Определение уровня продукции интерлейкина-1 мононуклеарными клетками крови при лечении гиперпластических нарушений кожи

В.А. ЦЕПКОЛЕНКО

ГП "Украинский НИИ медицины транспорта", г. Одесса

Examining the Level of Interleukin-1 (IL-1) Production by Blood Mononuclear Cells During Treatment of Hyperplastic Skin Deteriorations

V.A. TSEPKOLENKO

State Enterprise 'Ukrainian R&D Institute of Transport Medicine', Odessa

Уровень продукции интерлейкина-1 (ИЛ-1) мононуклеарными клетками у пациенток с гиперпластическим типом кожи и жалобами на косметическое состояние кожи был в 3,8 раза выше, чем у практически здоровых. Включение в комплекс лечебных мероприятий криоконсервированной ткани плаценты (КТП) сопровождалось существенным снижением продукции ИЛ-1 и редукцией клинических проявлений заболевания. Данные изменения были более выраженными, чем в условиях традиционного лечения косметических нарушений кожи.

Ключевые слова: косметические нарушения кожи, гиперпластическая кожа, цитокины, криоконсервированная ткань плаценты.

Рівень продукції інтерлейкіна-1 (ІЛ-1) мононуклеарними клітинами у пацієток з гіперпластичним типом шкіри та скаргами на косметичний стан шкіри був в 3,8 рази вищим, ніж у практично здорових жінок. Включення в комплекс лікувальних заходів криоконсервованої тканини плаценти супроводжувалося суттєвим зниженням продукції ІЛ-1 і редукцією клінічних проявів захворювання. Дані зміни були більш виразними, ніж за умов традиційного лікування косметичних порушень шкіри.

Ключові слова: косметичні порушення шкіри, гіперпластична шкіра, цитокіни, криоконсервована тканина плаценти.

The production level of interleukin-1 (IL-1) by blood mononuclear cells was significantly increased (by 3.8 times) in blood of patients with cosmetic hyperplastic skin deteriorations if compared with those of the control group. Administration of cryopreserved placenta tissue (CPT) as a part of combined treatment was accompanied with a considerable reduction of IL-1 production and clinical manifestations of the disease. These changes were more pronounced if compared with those for cosmetic skin deteriorations which were traditionally treated.

Key-words: cosmetic skin deteriorations, hyperplastic skin, cytokines, cryopreserved placenta tissue.

Интерлейкин-1 – это цитокин, который опосредует широкий спектр изменений в организме при развитии воспалительного процесса и продуцируется моноцитами и макрофагами [8]. Показано важное значение цитокинов-интерлейкинов, а также фактора, вызывающего некроз опухоли в патогенезе воспалительных нарушений кожных покровов [2, 7]. Однако систематизированные исследования продукции ИЛ-1 мононуклеарными клетками крови у женщин с косметическими нарушениями кожи лица не проводились.

Цель данной работы – определение уровня продукции ИЛ-1 мононуклеарными клетками крови у женщин с нарушением кожи лица по гиперпластическому типу [6] при использовании в комплексе лечения криоконсервированной ткани плаценты. Подобные лечебные воздействия

Interleukin-1 is a cytokine mediating a wide spectrum of changes in an organism during inflammation development and is produced by monocytes and macrophages [8]. There was shown an important value of cytokines-interleukins as well as the factor causing tumour necrosis in pathogenesis of inflammatory deteriorations of skin surfaces [2, 7]. However no summarized researches of IL-1 production by blood mononuclear cells in women with cosmetic deterioration of face skin were performed.

This research is aimed to the examining of IL-1 production level by mononuclear cells in blood of women with facial skin deteriorations of hyperplastic type [6] when using CPT as a part of the treatment. Similar therapeutic effects are of favourable influences under various diseases of women including the ones of involutive genesis [3, 4]. The choice of CPT was

Адрес для корреспонденции: Цепколенко В.А., ГП "Украинский НИИ медицины транспорта", ул. Бунина, 10, г. Одесса, Украина 65026

Address for correspondence: V.A. Tsepkolenko, Ukrainian R&D Institute of Transport Medicine, 10, Bunina str., Odessa, Ukraine 65026

обладают благоприятным эффектом при различных заболеваниях женского организма, в том числе инволютивного генеза [3, 4]. При выборе КТП также исходили из того, что данный препарат является гормонально активным, обеспечивает иммуномодулирующие эффекты, т.е. предположительно влияет на основные звенья патогенеза кожных косметических нарушений.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 29 женщин, которым в лечебный комплекс включали имплантацию КТП в подкожно-жировую клетчатку под местной инфильтрационной анестезией (0,5%-й раствор новокаина). Данный вид терапии одобрен комитетом по биоэтике Украинского НИИ медицины транспорта. Пациенткам подробно объясняли цель и суть лечения, от них получено письменное согласие на подкожную подсадку КТП. У 16 из них пластические хирургические вмешательства выполнялись в виде подтягивания кожи лица. Кроме того, у 11 женщин этой группы проведены липосакции и подтягивание кожи в области бедер и передней брюшной стенки. У 5 пациенток также выполняли дополнительную липосакцию, у 13 пациенток – холецистэктомию. Операцию проводили под общей анестезией, преимущественно лапароскопически и длительность ее составляла 60-90 мин. Осложнений после холецистэктомии не было. Средний возраст пациенток – $37,8 \pm 3,4$ года. Группу контроля составляли 25 женщин с аналогичным типом кожи, которым осуществляли традиционное косметическое лечение. Кроме того, 27 практически здоровых женщин составили группу сравнения. Обе группы не отличались от основной группы по показателю возраста.

Методика определения ИЛ-1 заключалась в выделении мононуклеарных клеток из крови в градиенте плотности фicolл-верографин [1]. Для разделения прилипающих и неприлипающих клеток суспензию мононуклеаров с концентрацией 2×10^6 на 1 мл среды RPMI-1640 с 10%-й инактивированной АВ (IV) сыворотки разливали по 0,2 мл в лунки пластиковых плоскодонных планшет и культивировали в течение 45 мин при 37°C и 5%-м содержании CO_2 . Неприлипшие клетки собирали (94% лимфоцитов) и хранили при 4°C . Прилипшие клетки (более 90% моноцитов) осторожно промывали несколько раз средой 199. Во все лунки добавляли по 0,1 мл среды RPMI-1640, содержащей 0,1%-го полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000 “Serva”, Германия) и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки активировались липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* 055 (“Serva”) импульсным методом. Для этого в одну часть лунок с моноцитами вносили

also stipulated by the fact that this preparation is hormonally active and provides immune modulating effects, i.e. it could affect main pathogenesis links of skin cosmetic deteriorations.

Materials and methods

There were 29 women under observation, for them as a part of therapeutic complex the CPT was introduced, which was implanted into subcutaneous fat under local infiltration anaesthesia (0.5% Novocain). This therapy was approved by the Bioethical Committee of the Institute. The patients were thoroughly explained about the aim and essence of treatment to be done, written consent for CPT subcutaneous implantation was obtained from them. Plastic surgical interventions for 16 of them were performed as facial skin lifting. In addition for 11 women of this group there were done liposuction and skin lifting of hips and anterior abdominal wall. Additional liposuction was done for 5 patients and cholecystectomy for 13 patients. Operation was done under general anaesthesia, predominantly laparoscopically and its duration made 60-90 min. No complications were found after cholecystectomy. An average age of patients made 37.8 ± 3.4 years old. Control group comprised 25 women with similar skin type, who were traditionally treated with cosmoceutic means. In addition 27 practically healthy women introduced the comparison group. Both groups did not differ from the main one on age index.

Technique of IL-1 examining consisted in isolation of mononuclear cells from blood in ficoll-verografin density gradient [1]. To separate adhering and non-adhering cells the suspension of mononuclear cells with the concentration of 2×10^6 per 1 ml RPMI-1640 medium with 10% inactivated AB (IV) serum was poured by 0.2 ml into wells of plastic flat bottom mattresses and cultured for 45 min at 37°C and 5% CO_2 . Non-adhered cells (more than 94% of lymphocytes) were collected and stored at 4°C . Adhered cells (more than 90% of monocytes) were carefully washed with medium 199 several times. Into all wells by 0.1 ml RPI-1640, containing 0.1% polyethylene glycol (PEG-6000 “Serva”, Germany) and 50 mg/ml gentamicin, were added. Cells were activated with *E. coli* 055 liposaccharide (LPS) (“Serva”) by impulse method. With this aim into one part of wells with monocytes LPS was added by 0.02 (20 mg/ml) and into another one RPMI-1640 medium by 0.02 ml and then incubated at 37°C and 5% content of CO_2 for various time intervals (30 and 90 min) [1]. All liquid after culturing was removed and wells with the cells were washed with medium 199. Afterwards to monolayer of monocytes there were added by 0.2 ml of non-adhered cells (lymphocytes) with the concentration of 2×10^6 per 1 ml RPMI-1640 medium

по 0,02 (20 мкг/мл) ЛПС, в другую – 0,02 мл среды RPMI-1640 и инкубировали при 37°C и 5%-м содержании CO₂ в течение различных интервалов времени (0,5 и 1,5) [1]. После окончания культивирования всю жидкость отсасывали и лунки с клетками промывали средой 199. Затем к монослою моноцитов добавляли по 0,2 мл неприлипших клеток (лимфоцитов) с концентрацией 2×10⁶ клеток на 1 мл среды RPMI-1640 с 20 мМ глутамина, 10%-й инактивированной АВ (IV) сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. В клеточную смесь, состоящую из активированных или интактных моноцитов и лимфоцитов, добавляли субоптимальную дозу (1 мкг/мл) фитогемагглютина (ФГА, “Serva”, Германия) в объеме 0,02 мл. Планшеты помещали в термостат при 37°C с 5%-м CO₂ и культивировали в течение 72 ч. После окончания реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) готовили мазок клеток, в которых морфологически определяли бластные клетки. Активность ИЛ-1 выражали индексом стимуляции пролиферации лимфоцитов (ИСПЛ) и определяли по формуле: ИСПЛ= О/К, где О – процент бластных клеток в пробах, содержащих моноциты, активированные липополисахаридом (ЛПС), и ФГА-стимулированные лимфоциты; К – процент бластных клеток в пробах, содержащих неактивированные (интактные) моноциты и ФГА-стимулированные лимфоциты. Иммунологические исследования осуществляли на 1-е и 7-е сутки с момента начала лечебных мероприятий.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием общепринятых в медико-биологических исследованиях критериев оценки различий между группами по Стьюденту-Фишеру.

Результаты и обсуждение

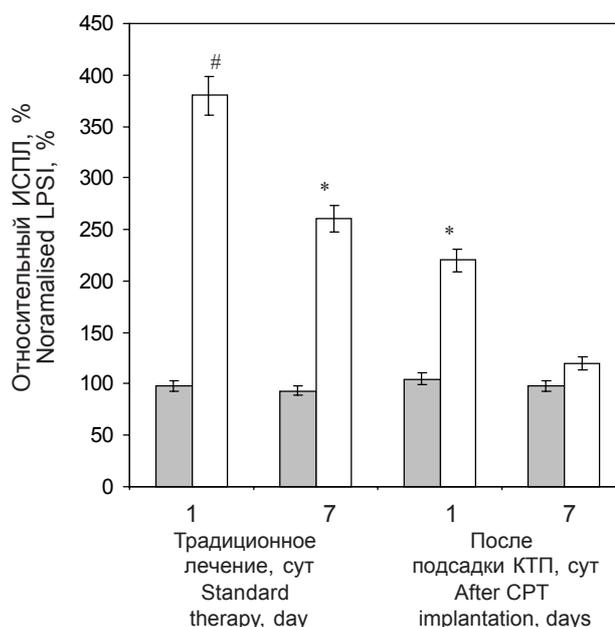
Изучение ИСПЛ в группе пациенток с традиционным лечением показало, что к концу 1-х суток с начала лечения уже при инкубации с ЛПС в течение 0,5 ч отмечалась выраженная тенденция к стимуляции РБТЛ: бластные клетки составили 27,2±3,2%, а в группе сравнения – 21,3±3,3% (P>0,05) (рисунок). При увеличении продолжительности инкубации до 1,5 ч ИСПЛ возрастал в 3,8 раза: бластные клетки составили 229,3±18,9%, у практически здоровых – 61,0±4,5% (P<0,001). Определение данного показателя на седьмые сутки с момента начала традиционного лечения показало, что ИСПЛ в этот период у практически здоровых также оставался в 2,6 раза выше (P<0,01).

В группе пациенток при трансплантации КТП установлено, что при продолжительности инкубирования моноцитов, обработанных ЛПС с

with 20 mM of glutamine, 10% inactivated AB (IV) serum and 50 mg/ml gentamicin. Into cell mixture consisting of activated or intact monocytes and lymphocytes a suboptimal dose (1 mg/ml) of phytohemagglutinin (PhHA, “Serva”, Germany) in 0.02 ml volume as added. Mattresses were placed into thermostat at 37°C with 5% CO₂ and cultured for 72 hrs. After finishing the lymphocyte blast transformation reaction (LBTR) there was prepared a smear of cells where morphologically blast cells were found. IL-1 activity was represented by lymphocyte proliferation stimulation index (LPSI) and determined by the formula: LPSI = O/K, where O – is percent of blast cells in samples containing monocytes activated by lipopolysaccharides (LPS) and PhHA – stimulated lymphocytes; K – percent of blast cells in samples containing non-activated (intact) monocytes and PhHA-stimulated lymphocytes. Immunological studies were performed to the first and seventh days from the moment of therapeutic measures start.

Results and discussion

Study of LPSI in the group of traditionally treated patients showed that to the end of first 24hrs from the start of treatment even during incubation with LPS



Динамика индекса стимуляции пролиферации лимфоцитов у пациенток с гиперпластическим типом нарушений кожи в различных условиях лечения (отношение к значениям группы практически здоровых): ■ – 30 мин инкубации лимфоцитов с ФГА; □ – 90 мин инкубации лимфоцитов с ФГА; * – P<0,01, # – P<0,001 в сравнении с группой контроля.

Dynamics of LPSI in patients with hyperplastic type of skin deteriorations under various treatment conditions (normalised to data of healthy patients): ■ – 30 min incubation of lymphocytes with PhHA; □ – 90 min incubation of lymphocytes with PhHA; * – P< 0.01; # – P< 0.001 in comparison with the control group.

течение 0,5 ч, не отмечалось влияния на РБТЛ иммунокомпетентных клеток: бластные клетки составили в контроле $18,8 \pm 3,2\%$ и у пациенток с косметическими нарушениями кожи – $21,2 \pm 2,7\%$ ($P > 0,05$). Инкубация с ЛПС в течение 1,5 ч вызывала способность усиливать пролиферацию лимфоцитов в ответ на субоптимальную дозу ФГА, что проявлялось в увеличении ИСПЛ в среднем до 2,2 – возрастанием количества бластных клеток до $128,5 \pm 11,8$ ($P < 0,01$). На 7-е сутки с момента начала лечения наблюдалось снижение ИСПЛ, значение которого не отличалось от такового в группе контроля ($P > 0,05$).

Клиническое обследование состояния кожи лица показало существенное снижение кератоза при трансплантации КТП. Так, в условиях применения традиционного косметологического лечения у 7 из 25 женщин отмечалось практически полное исчезновение статических морщин к 10-му дню лечения, у женщин с применением КТП такой же результат наблюдался у 23 из 29 случаев. Через 2 месяца с момента завершения лечения выявлен устойчивый лечебный эффект у большинства пациенток, получавших КТП (21 из 29), а в группе с применением традиционного лечения сходный эффект был у 6 из 25 случаев.

Проведенные исследования показали, что при косметических нарушениях кожи по гиперпластическому типу у пациенток наблюдается рост продукции ИЛ-1 моноцитами крови. Данный эффект проявляется в выраженном увеличении продукции цитокина до начала лечения, что свидетельствует о патогенетическом значении ИЛ-1 в формировании косметических нарушений кожных покровов [7]. Важным является тот момент, что ранее речь шла об идентификации воспалительных изменений кожи как источнике цитокинов. Полученные данные подтверждают, что гиперпластический тип кожи также характеризуется гиперпродукцией цитокинов, хотя для этой кожи не свойственны воспалительные реакции [6]. В то же время можно полагать, что гиперкератоз в данном случае может быть результатом усиленного апоптоза эпителиальных клеток, стимуляция которого характерна для действия провоспалительных цитокинов [5].

Благоприятная динамика косметических нарушений связана с некоторым снижением содержания ИЛ-1 в плазме крови, но у пациенток, получавших традиционное лечение, подобного эффекта не наблюдалось.

Приведенные данные свидетельствуют о противовоспалительном характере влияния КТП, которое может быть реализовано снижением продукции цитокинов. Поэтому применять КТП в

for 30 min there was found manifested tendency to LBTR stimulation: blast cells made $27.2 \pm 3.2\%$ and in the group of comparison these indices were as follows $21.3 \pm 3.3\%$ ($P > 0.05$) (Figure). During a rise in incubation duration up to 90 min LPSI increased in 3.8 times: blast cells made $229.3 \pm 18.9\%$ and for practically healthy women they were $61.0 \pm 4.5\%$ ($P < 0.001$). This index examining to the seventh day from the moment of starting traditional treatment has shown that LPSI during this period in practically healthy women was kept 2.6 times higher ($P < 0.01$).

In the group of patients during CPT transplantation it was found that at prolonged incubation of LPS-treated monocytes for 30 min there was found no effect of immune competent cells on LBTR: blast cells made in control $18.8 \pm 3.2\%$ and in patients with cosmetic skin deteriorations they were $21.2 \pm 2.7\%$ ($P > 0.05$). Incubation with LPS for 90 min caused an ability to strengthen proliferation of lymphocytes in response to suboptimal PhHA dose that manifested in a rise in LPSI in average up to 2.2, an increase in the number of blast cells up to 128.5 ± 11.8 ($P < 0.01$). To the 7th day from the moment of treatment start there was observed reduction of LPSI the value of which did not differ from that for the control group ($P > 0.05$).

Clinical observation of face skin state has shown a considerable reduction of keratosis at CPT transplantation. Moreover when traditional cosmetological treatment was performed for 7 women among 25 there was found practically complete disappearance of static wrinkles to the 10th treatment day, for women treated with CPT the same result was observed for 23 women among 29. In 2 months from the moment of treatment termination in the majority of patients treated with CPT (21 among 29) there was found a stable therapeutic effect if compared with the traditionally treated the similar effect was found in 6 of 25 patients.

Performed studies have demonstrated that at cosmetic deteriorations of skin on hyperplastic type for the patients was observed the growth of IL-1 production by blood monocytes. This effect is manifested in a pronounced rise of cytokine production before treatment start, that testifies to a pathogenetic value of IL-1 in the formation of cosmetic deteriorations of skin integuments [7]. Of importance is the fact that previously the matter was identification of inflammatory skin changes as a source of cytokines. The obtained data confirm that hyperplastic skin type is also characterized with hyperproduction of cytokines, though for this type of skin inflammatory reactions are not characteristic [6]. At the same time it could be supposed that hyperkeratosis in this case may be the result of strengthened apoptosis of epithelial cells, stimulation of which is characteristic for the action of pro-inflammatory cytokines [5].

комплексе лечебных мероприятий при гиперпластических изменениях кожных покровов, отличающихся резистентностью к традиционному лечению, целесообразно.

Выводы

Косметические нарушения кожи лица, идентифицируемые в контексте гиперпластических изменений кожных покровов, связаны с высокой способностью мононуклеарных клеток продуцировать ИЛ-1.

Криоконсервированная ткань плаценты снижает продукцию ИЛ-1 мононуклеарными клетками крови, что вызывает необходимость продолжить исследования по использованию КТП в эстетической медицине.

Литература

1. Адаменко Г.П. Метод определения интерлейкина-1 в культуре лимфоцитов и активированных импульсным способом моноцитов крови человека // Лаб. дело.– 1990.– №5.– С. 42-45.
2. Адаменко Г.П., Козин В.М. Клинико- лабораторная оценка цитокинов при воспалительных заболеваниях кожи // Вестн. дерматол. и венерологии.– 1993.– №3.– С.11-15.
3. Грищенко В.И., Чуб Н.Н., Демина Л.Г. и др. Возможность использования криоконсервированной овариальной ткани в акушерско- гинекологической практике // Новые технологии получения и применения биологически активных веществ: Тезисы докладов.– Симферополь, 2002.– С. 139.
4. Луценко Н.С., Ломака И.В., Кириченко И.Н. Опыт применения гетеротопической трансплантации криоконсервированной плаценты у женщин в перименопаузе // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 88.
5. Лю Б.Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма // Успехи современной биологии.– 2001.– Т. 121.– №5.– С. 488-501.
6. Цепколенко В.О., Насібулін Б.А. Структурно- функціональна оцінка стану шкіри в реабілітаційній косметології // Дерматологія та венерологія.– 2002.– №3.– С. 53-55.
7. Цепколенко В.О. Залежність типу зморшкватості та функціонального стану шкіри від рівня цитокинів крові // Буковин. мед. вісник.– 2003.– №1-2.– С.161-163.
8. Pellegrino M., Minervini B. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. Two possible mediators of allergic inflammation // Minerva Pediatr.– 1996.– Vol. 48, N7-8.– P. 309-312.

Поступила 09.08.2005.

Favourable dynamics of cosmetic deteriorations is related to some decrease in IL-1 content in blood plasma, but in traditionally treated patients no similar effect was observed.

Demonstrated data testify to anti-inflammatory character of CPT effects which may be realized by a reduction in cytokine production. Therefore it is expedient to apply CPT as a part of combined treatment measures at hyperplastic changes of skin integuments, which are resistant to traditional treatment.

Conclusions

Cosmetic deteriorations of facial skin identified as hyperplastic changes of skin covers are related to a high ability of mononuclear cells to produce IL-1.

Cryopreserved placenta tissue reduces production of IL-1 by blood mononuclear cells that causes a need to continue studies on the use of CPT in aesthetic medicine.

References

1. Adamenko G.P. Method of examining interleukin-1 in lymphocyte culture and impulse-activated human blood monocytes // Lab. Delo. – 1990.– N5.– P. 42-45.
2. Adamenko G.P., Kozin V.M. Clinical and laboratory assessment of cytokines at inflammatory skin diseases // Vestn. Dermatologii i Venerologii.– 1993.– N3.– P. 11-15.
3. Grischenko V.I., Chub N.N., Demina L.G. et al. Possibility to use cryopreserved ovarian tissue in obstetrical and gynaecological practice // New techniques of obtaining and application of biologically active substances: Proceedings of the Conference.– Simferopol, 2002.– P. 139.
4. Lutsenko N.S., Lomaka I.V., Kirichenko I.N. Experience of application of heterotopic transplantation of cryopreserved placenta in women in perimenopause // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 171.
5. Lu B.N. Oxygen-peroxide conception of apoptosis and possible variants of its mechanism// Uspekhi Sovremennoy Biologii. – 2001. – Vol. 121, N5. – P. 488-501.
6. Tsepkoenko V.O. , Nasibulin B.A. Structural and functional assessment of skin status in rehabilitation cosmetology// Dermatologiya ta Venerologiya. – 2002. – N3. – P. 53-55.
7. Tsepkoenko V.O. Dependence of wrinkleness type and functional state of skin on level of blood cytokines // Bukovin. Med. Visnyk. – 2003. – N1-2. – P. 161-163.
8. Pellegrino M., Minervini B. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. Two possible mediators of allergic inflammation // Minerva Pediatr.– 1996.– Vol. 48, N7-8.– P. 309-312.

Accepted in 09.08.2005