

Alprostadil and pentoxifylline influence on the ability of monocytes to release extrinsic pathway factors in patients with peripheral arterial occlusive disease

Wpływ alprostadilu i pentoksyfiliny na uwalnianie przez monocyty czynników zewnątrzopochodnego układu krzepnięcia u chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych

Marzenna Klimiuk¹, Marzenna Galar¹, Piotr Klimiuk², Piotr Radziwon¹, Jan Giedroń¹,
Marta Pszczołka¹, Janusz Kłoczko¹

¹Department of Haematology, Medical Academy, Białystok, Poland (Klinika Hematologii Akademii Medycznej w Białymstoku)

²Department of Rheumatology, Medical Academy, Białystok, Poland (Klinika Reumatologii Akademii Medycznej w Białymstoku)

Abstract

Background. Monocytes — mononuclear white cells, apart from their versatile contribution in inflammatory and immunological processes, play an important role in disorders of the haemostasis system, which are the basis of the atherosclerosis progress. In a present study, an assessment of the influence of the active vessel agents — alprostadil and pentoxifylline therapy — on the ability of monocytes to release extrinsic pathway factors was carried out.

Material and methods. The study was performed on 30 men who suffered from peripheral arterial occlusive disease (stage II, according to Fontaine) hospitalized in the Department of Haematology, Medical Academy, Białystok. The patients were divided into two groups of 15 people each. Blood was collected before and after infusion of the study medicine. Monocytes were isolated from whole blood according to the methods of Böyum with the authors' own modifications. The isolated monocytes were incubated in the RPMI-1640 medium in the presence of the lipopolysaccharide *Escherichia coli* (LPS) at 37°C under 5% CO₂ for 36 h. Tissue factor concentration (TF), factor VII activity and factor X concentration were assessed in the liquid of the incubated monocytes.

Results. Alprostadil infusion significantly decreased factor X release from the isolated monocytes. Pentoxifylline used intravenously significantly decreased the release of factors VII and X. In the present study, the influence of the study medicine on the ability of monocytes to release the tissue factor was not recorded.

Conclusions. Our study demonstrated that intravenous infusion of alprostadil and pentoxifylline in patients suffering from occlusive disease significantly decreased the ability of monocytes to release extrinsic pathway factors — factor VII and X. The obtained results indicate a novel anti-atherosclerotic quality of alprostadil and pentoxifylline.

Key words: TF, VII, X, atherosclerosis

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Marzenna Klimiuk, Klinika Hematologii AM
ul. M.C. Skłodowskiej 24 a, 15–276 Białystok, Poland
tel: +48 (85) 746 86 03, fax: +48 (85) 744 70 26
e-mail: marzennaklimiuk@yahoo.com

Streszczenie

Wstęp. Monocyty — jednojądrzaste krwinki białe — poza wszechstronnym udziałem w procesach zapalnych i reakcjach immunologicznych odgrywają istotną rolę w zaburzeniach hemostazy, które leżą u podłoża rozwoju miażdżycy. W pracy dokonano oceny wpływu terapii lekami naczynioaktywnymi — alprostadilem (PGE_1) i pentoksyfilią — na zdolność monocytów do uwalniania czynników zewnątrzprzochodnego układu krzepnięcia.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono u 30 mężczyzn chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych (II okres wg klasyfikacji Fontaine'a), hospitalizowanych w Klinice Hematologii Akademii Medycznej w Białymstoku. Pacjentów podzielono na dwie 15-osobowe grupy. Krew do badań pobierano przed podaniem badanych leków i po nim. Monocyty izolowano z krwi pełnej według metody Böyum w modyfikacji własnej. Wyizolowane monocyty hodowano na podłożu płynnym RPMI-1640 w obecności lipopolisacharydu *Escherichia coli* (LPS) w temperaturze 37°C i atmosferze 5-procentowego CO_2 przez okres 36 godzin. W płynie inkubacyjnym hodowli monocytów oznaczano stężenie czynnika tkankowego (TF), aktywność czynnika VII oraz stężenia czynnika X.

Wyniki. Wlew PGE_1 powodował istotnie zmniejszenie uwalniania czynnika X przez izolowane monocyty. Pentoksyfiliina stosowana dożylnie wpływała na znamienne zmniejszenie uwalniania czynników VII i X. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono wpływu badanych leków na zdolność monocytów do uwalniania TF.

Wnioski. W badaniach tych wykazano, że dożylne wlewy PGE_1 i pentoksyfiliny u chorych na miażdżycę zarostową zmniejszają istotnie zdolność monocytów do uwalniania składowych układu krzepnięcia — czynnika VII i X. Uzyskane wyniki wskazują na nowy mechanizm przeciwmiażdżycowego działania PGE_1 i pentoksyfiliny.

Słowa kluczowe: TF, VII, X, miażdżycy

Introduction

Peripheral arterial occlusive disease (PAOD) belongs to the group of diseases with complicated pathogenesis, in which inflammatory processes and disorders of the haemostatic system play an important role [1].

Mononuclear white cells (monocytes) take part in these both processes [1–3]. Activated monocytes synthesize and release many components, which directly and indirectly activate coagulation processes.

Monocytes and macrophages release interleukins (IL): 1, 6, 8, and 10, tumour necrosis factor α ($TNF\alpha$), elastase and collagenase, derivatives of the arachidonic acid — prostacyclin (PGI_2) and thromboxane (TXA_2), glycoproteins, hydrogen peroxide and platelet activated factor (PAF), which play an important role in the regulation of inflammatory and atherosclerotic processes [4–13].

Monocytes synthesize and release a range of coagulation factors: II, V, VII, IX, X, XII and multi-molecular kininogen [3]. They have the ability to initiate coagulation through the expression and release of tissue factor (TF) — the main coagulation system initiator [14–18].

Monocytes take up to 2/3 of the amount of cells present in the central part of atherosclerotic plaque [19, 20].

Wstęp

Miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych (PAOD) należy do chorób o złożonej patogenezie, w której powstaniu i rozwoju istotne znaczenie przypisuje się procesowi zapalnemu i zaburzeniom krzepnięcia krwi [1].

W obydwu tych procesach biorą udział jednojądrzaste krwinki białe — monocyty [1–3]. Pobudzone monocyty syntezują i wydzielają liczne czynniki, które pośrednio i bezpośrednio aktywują proces krzepnięcia.

Monocyty i pochodzące z nich makrofagi uwalniają interleukiny (IL) 1, 6, 8 i 10, czynnik martwicy nowotworu α ($TNF\alpha$), elastazę i kolagenazę, pochodne kwasu arachidynowego — prostacyklinę (PGI_2) i tromboksan (TXA_2), glikoproteiny, aniony nadtlenu oraz czynnik aktywujący płytki krwi (PAF), odgrywające istotną rolę w regulacji procesu zapalnego i krzepnięcia [4–13].

Monocyty syntezują i uwalniają wiele czynników krzepnięcia: II, V, VII, IX, X, XII i wielocząsteczkowy kininogen [3]. Mogą zapoczątkować proces krzepnięcia krwi poprzez ekspresję i uwalnianie czynnika tkankowego (TF) — głównego inicjatora kaskady krzepnięcia [14–18].

Monocyty stanowią 2/3 ilości komórek obecnych w centralnej części blaszki miażdżycowej [19, 20]. Tam

In addition, great activity of TF can be detected in the plaque [17, 21–25]. Monocytes/macrophages of patients suffering from PAOD synthesize and release increased amounts of coagulation factors VII and X [10, 26–28].

In the treatment of occlusive disease, agents are used which improve rheological qualities of the blood and increase blood flow in the limb. These drugs include endogenous prostacyclin analogue (PGI₂) — alprostadil and pentoxifylline, the usefulness of which is frequently questioned [29–30]. The results from previous studies showed that the positive treatment effects brought about by this kind of medication might be connected, at least in part, with their influence on monocyte functions [27, 31–35]. In the present study, we attempted to assess the *in vivo* influence of alprostadil and pentoxifylline on the ability of monocytes to release extrinsic pathway factors — TF, factor VII and factor X — in patients with PAOD.

Material and methods

The study was performed on 30 men (mean age 61.1 ± 9.3 years) suffering from peripheral arterial occlusive disease (stage II, according to Fontaine) hospitalized in the Department of Haematology, Medical Academy, Białystok.

We excluded patients who were given the following medication two weeks or less prior to the study:

- cyclo-oxygenase inhibitors (aspirin, indometacine);
- phosphodiesterase inhibitors (euphylline, theophylline);
- α and β adrenergic and cholinergic inhibitors;
- calcium channel blockers.

The patients were divided into two groups of 15 people, which adequately received:

- group 1 — one 4-h 40 μ g alprostadil (Prostavasin, Schwarz Pharma) intravenous infusion in 500 ml of 0.9% NaCl;
- group 2 — one 4-h 600 mg pentoxifylline (Polfilin, Polpharma PL) intravenous infusion in 500 ml of 0.9% NaCl.

Blood was collected before and after 4h venous infusion in plastic syringes using heparin (10 IU/ml).

Monocytes were isolated from the whole blood according to the Böyum method [36] with the authors' own modifications. The blood, having first been diluted in a phosphate-buffered saline (PBS), was layered onto a Ficoll-Paque cushion and then centrifuged at room temperature. The cells were washed in PBS and then washed twice in 5 mM EDTA-PBS solution and finally washed once in PBS. Erythrocytes were removed by hemolysis. Platelets adhering to monocytes were removed using Pawlowski's method [37]. Then the monocy-

również zlokalizowano duże ilości TF i jego zwiększoną aktywność [17, 21–25]. Monocyty/makrofagi chorych na PAOD syntezują i uwalniają także zwiększone ilości czynnika VII i X krzepnięcia [10, 26–28].

W leczeniu miażdżycy zarostowej stosuje się między innymi leki poprawiające właściwości reologiczne krwi i zwiększające ukrwienie kończyn. Należą do nich analog endogennej prostacykliny (PGI₂) — alprostadil (PGE₁) oraz pentoksyfilina, której przydatność coraz częściej się kwestionuje [29–30]. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że pozytywne efekty leczenia wyżej wymienionymi preparatami mogą mieć związek, przynajmniej częściowo, z ich wpływem na funkcje monocytów [27, 31–35]. W pracy podjęto próbę oceny wpływu PGE₁ i pentoksyfiliny, stosowanych *in vivo* u chorych na PAOD, na zdolność monocytów do uwalniania składowych układu krzepnięcia — TF, czynnika VII i X.

Material i metody

Badania przeprowadzono wśród 30 mężczyzn (średnia wieku $61,1 \pm 9,3$ roku) chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych (II okres wg klasyfikacji Fontaine'a), hospitalizowanych w Klinice Hematologii Akademii Medycznej w Białymstoku (Polska).

Z badań wyłączano osoby, które w okresie ostatnich 2 tygodni przyjmowały:

- inhibitory cyklooksygenazy (kwas acetylosalicylowy, indometacynę);
- inhibitory fosfodwuesterazy (eufilinę, teofilinę);
- leki wywierające wpływ na receptory α - i β -adrenergiczne oraz cholinergiczne;
- inhibitory kanału wapniowego.

Chorych podzielono losowo na dwie 15-osobowe grupy, które otrzymywały odpowiednio:

- grupa 1 — jednorazowy 4-godzinny wlew dożylny 40 μ g alprostadilu (Prostavasin, Schwarz Pharma) w 500 ml 0,9-procentowego NaCl;
- grupa 2 — jednorazowy 4-godzinny wlew dożylny 600 mg pentoksyfiliny (Polfilin, Polpharma PL) w 500 ml 0,9-procentowego NaCl.

Krew pobierano przed 4-godzinnym dożylnym wlewem i po nim do plastikowych strzykawek zawierających heparynę (10 IU/ml).

Monocyty izolowano z krwi pełnej według metody Böyum [36] w modyfikacji własnej. Krew rozcieńczano buforem fosforanowym (PBS), a następnie nawarstwiano na Ficoll Paque i wirowano w temperaturze pokojowej. Komórki jednojądrzaste płukano PBS, a następnie 2-krotnie 5 mM roztworem EDTA-PBS, a potem jeszcze raz PBS. Erytrocyty usuwano za pomocą hemolizy. Płytki krwi przylegające do monocytów usuwano, sto-

tes were resuspended in the RPMI-1640 supplemented with 20% inactivated autologous serum and antibiotics. The monocytes were then incubated at 37°C in plastic Greiner plates in the presence of 5% CO₂. After incubation, lymphocytes were removed by washing three times with the RPMI-1640 medium. The monocytes were detached from the RPMI-1640 medium by exposure to 4°C for 20 min.

The isolated monocytes, at a concentration of $2-3 \times 10^5$ cells/ml, were incubated in the RPMI-1640 medium enriched with lipopolysaccharide *E. coli* (LPS) at 37°C under 5% CO₂ for 36 h.

The content of monocytes was measured with esterase — Swirsky stain [38] and was found to be 97%. A test of cell vitality was performed using trypan blue staining.

In the liquid from the incubated monocytes, the following substances were assessed:

- tissue factor concentration by Imubind TF Elisa Kit (American Diagnostica);
- factor VII activity by COASET FVII (Chromogenix);
- factor X concentration by Asserachrom X:Ag (Diagnostica Stago).

Analysis of the obtained results included calculations of arithmetic mean (X) and standard deviation (SD). The t-Student test was also used.

Results

The average concentrations of TF and factors VII and X in the incubated monocytes liquid obtained from the patients who suffered from PAOD before and after 4 h venous alprostadil and pentoxifylline infusion are shown in Table I.

Alprostadil and pentoxifylline infusion did not have any significant influence on the ability of the monocytes to release TF ($p > 0.05$) Figure 1.

Whereas alprostadil infusion slightly decreased factor VII release ($p > 0.05$), pentoxifylline infusion significantly inhibited it ($p < 0.001$) — Figure 2.

sując metodę według Pawlowskiego [37]. Następnie monocyty przenoszono do płynnego podłoża RPMI-1640 z dodatkiem 20-procentowej surowicy autologicznej i antybiotyków. Potem monocyty inkubowano w plastikowych naczyniach typu Greiner w temperaturze 37°C w obecności 5-procentowego CO₂. Po inkubacji limfocyty usuwano, 3-krotnie płuczając naczynia podłożem RPMI-1640. Monocyty odwarstwiano od podłoża RPMI-1640 w temperaturze 4°C przez 20 minut.

Wyizolowane monocyty ($2-3 \times 10^5$ cells/ml) były inkubowane w płynnym podłożu RPMI-1640 wzbogaconym lipopolisacharydem *E. coli* (LPS) przez 36 godzin w temperaturze 37°C w obecności 5-procentowego CO₂.

Zawartość monocytów oceniana z zastosowaniem esterazy — metodą Swirsky'ego [38] — wynosiła 97%. Żywotność komórek określano, stosując barwienia błękitem trypanu.

W płynie inkubacyjnym monocytów oznaczano:

- stężenie czynnika tkankowego, stosując zestaw IMUBIND TF Elisa Kit firmy American Diagnostica;
- aktywność czynnika VII, stosując zestaw COASET FVII firmy Chromogenix;
- stężenie czynnika X, stosując zestaw ASSER-ACHROM X:Ag firmy Diagnostica Stago (wyniki wyrażano w procentach standardowego ludzkiego osocza zawierającego czynnik X).

Analiza otrzymanych wyników zawierała obliczenia średniej arytmetycznej (X) i odchylenie standardowe (SD). Zastosowano test t-Studenta.

Wyniki

Średnie wyniki pomiaru TF, czynnika VII i czynnika X w płynie inkubacyjnym hodowli monocytów uzyskanych od chorych na PAOD przed 4-godzinnym wlewem PGE₁ i pentoksyfiliny i po nim przedstawiono w tabeli I.

Dożylny wlew PGE₁ i pentoksyfiliny nie wpływał istotnie na zdolność monocytów do uwalniania TF ($p > 0,05$) (ryc. 1).

Table I. The mean TF, factor VII, X values (\pm SD) in the liquid from incubated monocytes before and after alprostadil and pentoxifylline venous infusion

Tabela I. Średnie wartości TF, czynnika VII, X (\pm SD) w płynie inkubacyjnym hodowli monocytów uzyskanych przed wlewem dożylnym alprostadilu i pentoksyfiliny i po nim

	Alprostadil (n = 15)		Pentoxifylline (n = 15) Pentoksyfilina	
	Before infusion Przed wlewem	After 4-h infusion Po 4-godzinnym wlewie i.v.	Before infusion Przed wlewem	After 4-h infusion Po 4-godzinnym wlewie i.v.
TF [pg/ml]	228.39 \pm 57.26	231.06 \pm 65.39	216.62 \pm 55.13	223.64 \pm 61.60
VII (%)	53.09 \pm 22.09	42.15 \pm 5.88	65.40 \pm 15.51	28.52* \pm 6.63
X (%)	81.98 \pm 7.52	10.05* \pm 5.92	66.82 \pm 9.03	18.29* \pm 7.28

TF — tissue factor (czynnik tkankowy); VII — factor VII (czynnik VII); X — factor X (czynnik X); i.v. — intravenous (dożylnie); * $p < 0.001$

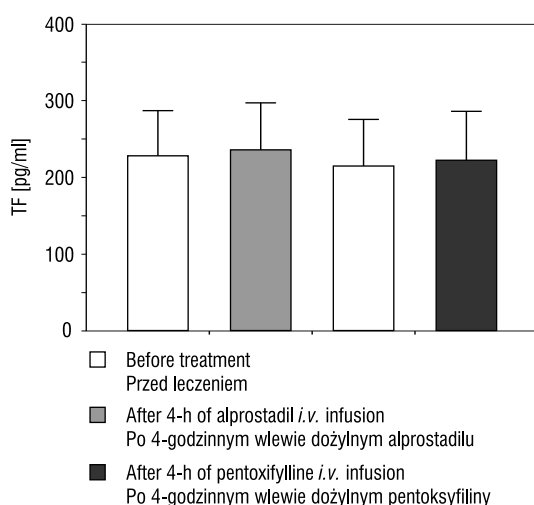


Figure 1. The mean tissue factor (TF) concentration (\pm SD) in the liquid from incubated monocytes received from the patients with peripheral arterial occlusive disease (15) before and after alprostadil and pentoxifylline venous infusion

Rycina 1. Średnie stężenie czynnika tkankowego (TF) (\pm SD) w płynie inkubacyjnym hodowli monocytów uzyskanych od chorych na miażdżycę zarostową ($n = 15$), przed dożylnym podaniem alprostadilu i pentoksyfiliny i po nim

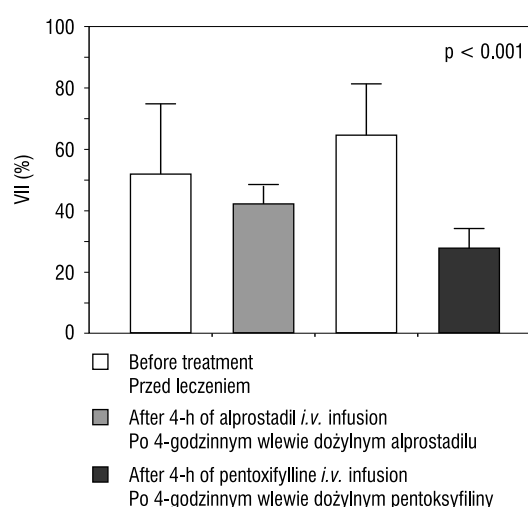


Figure 2. The mean factor VII (VII) activity (\pm SD) in the liquid from incubated monocytes received from the patients with peripheral arterial occlusive disease (15) before and after alprostadil and pentoxifylline venous infusion

Rycina 2. Średnia aktywność czynnika VII (VII) (\pm SD) w płynie inkubacyjnym hodowli monocytów uzyskanych od chorych na miażdżycę zarostową ($n = 15$), przed dożylnym podaniem alprostadilu i pentoksyfiliny i po nim

Alprostadil and pentoxifylline significantly inhibited factor X release ($p < 0.001$) — Figure 3.

Discussion

Alprostadil (PGE_1), an analogue of endogenous prostacyclin (PGI_2), is widely employed in the treatment of occlusive disease.

PGE_1 employed intravenously causes a significant increase in intermittent claudication [39–42]. Belcaro et al. [43] after 6 months of intravenous treatment with PGE_1 of patients with PAOD obtained not only an increased intermittent claudication, but also a disappearance of the critical ischaemia symptoms in 75% of the patients.

Makita et al. [44] observed an increased blood flow in the shank of patients with PAOD receiving PGE_1 . Milo et al. [45] showed that PGE_1 increases blood flow in microcirculation, causing progress of collateral circulation and prolonged intermittent claudication in PAOD.

The use of pentoxifylline, according to some authors, leads to a prolongation of intermittent claudication in patients [30, 46–48]; according to others, its effects are similar to those of a placebo [29].

De Sanctis et al. [49], Incandela et al. [40] and Poggesi et al. [50] observed an increased blood flow through the peripheral vessels in patients with PAOD receiving pentoxifylline. Trubestein et al. [51] compared PGE_1 and pentoxifylline actions and stated that PGE_1 shows a greater efficiency in ulcerations and necrotic changes treatment in PAOD.

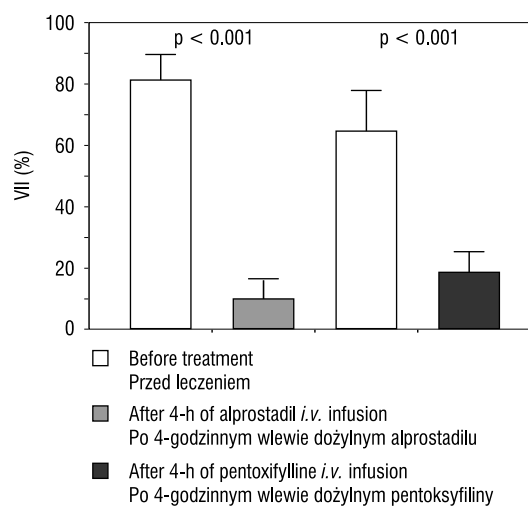


Figure 3. The mean factor X (X) activity (\pm SD) in the liquid from incubated monocytes received from the patients with peripheral arterial occlusive disease (15) before and after alprostadil and pentoxifylline venous infusion

Rycina 3. Średnia aktywność czynnika X (X) (\pm SD) w płynie inkubacyjnym hodowli monocytów uzyskanych od chorych na miażdżycę zarostową ($n = 15$), przed dożylnym podaniem alprostadilu i pentoksyfiliny i po nim

Dożylny wlew PGE_1 zmniejszał nieznacznie uwalnianie czynnika VII ($p > 0,05$), natomiast wlew pentoksyfiliny hamował je znacząco ($p < 0,001$) (ryc. 2).

Zarówno PGE_1 , jak i pentoksyfilina hamowały znacząco ($p < 0,001$) uwalnianie czynnika X (ryc. 3).

The positive clinical effects observed in patients treated with PGE₁ and pentoxifylline are mainly anti-inflammatory and anticoagulation results [31–35, 52–53]. Studies performed in previous years indicated that at least some of those effects may be the result of the influence of the studied drugs on monocytes [27, 31–35].

Our own studies demonstrated that alprostadil and pentoxifylline intravenous infusions significantly increased procoagulative functions of monocytes. Alprostadil infusion significantly decreased factor X release by the isolated monocytes. Pentoxifylline in intravenous infusion significantly decreased factor VII and X release. The present study did not indicate any influence of the study drugs on the ability of monocytes to release TF.

The observed decrease of the procoagulative activity of the monocytes, after the application of the studied vessels (active agents), occurs through a reduction in the release of factors VII and X and seems to be connected, at least in part, with their influence on inflammatory processes. Stenson et al. [54] showed that exogenous PGE₂ stops the adhesion, spreading and migration of macrophages. Hanazawa et al. [23] showed that pentoxifylline application to rats after reperfusion prevented leucocytes rolling and adhering to endothelium. Matsui et al. [32] obtained a decrease of the chemotactic monocyte protein I (MCP-1) level after intravenous PGE₁ infusion. Palumbo et al. [33] obtained a significant reduction of the circulating adhesive molecule concentration (ICAM-1, E-selectin, VCAM-1) after employing PGE₁. Gianetti et al. [55] employed PGE₁ in patients with PAOD and observed a significant decrease of monocytes activity due to a decrease of VCAM-1 concentration. PGE₁ also decreases endothelin-1 concentration in blood plasma [56].

As was shown in previous studies, pentoxifylline also decreased leukocyte and monocyte activity [52–53]. Neuner et al. [57] studied the action of pentoxifylline *in vitro* and *in vivo* and observed a decrease of ICAM-1 expression in monocytes. Dosquet et al. [58] stated that pentoxifylline causes a decrease in monocyte adhesion to endothelium in healthy people and in patients with diabetes. Rao et al. [59] stated that pentoxifylline used for two months inhibited cytokine synthesis by leucocytes in patients with PAOD. Pentoxifylline also stimulates PGI₂ synthesis [50].

The studies of other authors, similarly to the results our own work, show the direct influence of the studied medicines on procoagulative and anticoagulative monocyte functions. Crutchley et al. [31] showed that PGE₁ is a physiological modulator of the TF expression on monocytes.

Omówienie wyników

Alprostadil, analog endogennej prostacykliny (PGI₂), powszechnie stosuje się w leczeniu chorych z miażdżycą zarostową.

Alprostadil stosowany dożylnie wydłuża znacznie dystans chromania przestankowego [39–42]. Belcaro i wsp. [43], stosując dożylnie PGE₁ u chorych na PAOD przez okres 6 miesięcy uzyskali nie tylko wydłużenie dystansu chromania przestankowego, ale także zniknęły objawy krytycznego niedokrwienia aż u 75% pacjentów.

Makita i wsp. [44] obserwowali zwiększony przepływ krwi przez podudzie u chorych na PAOD otrzymujących PGE₁. Milo i wsp. [45] wykazali, że PGE₁ zwiększa przepływ krwi w mikrokrążeniu, powoduje rozwój krążenia obocznego i wydłuża dystans chromania przestankowego w PAOD.

Zdaniem niektórych badaczy pentoksyfilina powoduje również wydłużenie dystansu chromania przestankowego u chorych [30, 46–48], inni specjaliści uważają, że wywiera efekt porównywalny do placebo [29].

De Sanctis i wsp. [49], Incandela i wsp. [40], a także Poggessi i wsp. [50] obserwowali zwiększenie przepływu krwi przez naczynia obwodowe u chorych na PAOD otrzymujących pentoksyfilinę. Trubestein i wsp. [51], porównując działanie PGE₁ i pentoksyfiliny stwierdzili, że PGE₁ wykazuje większą skuteczność w leczeniu owrzodzeń i zmian martwiczych w PAOD.

Pozytywne efekty kliniczne obserwowane u chorych leczonych PGE₁ i pentoksyfiliną są w znacznym stopniu następstwem ich działania przeciwzapalnego i przeciwzakrzepowego [31–35, 52–53]. W badaniach przeprowadzonych we wcześniejszych latach wykazano, że przynajmniej część efektów może być wynikiem wpływu tych leków na monocyty [27, 31–35].

W badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy wykazano, że dożylnie wlewy PGE₁ i pentoksyfiliny powodują istotne zmniejszenie prozakrzepowych funkcji monocytów. Wlew PGE₁ zmniejszył istotnie uwalnianie czynnika X przez izolowane monocyty. Pentoksyfilina stosowana dożylnie znamienne zmniejsza uwalnianie czynników VII i X. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono wpływu ocenianych leków na zdolność monocytów do uwalniania TF.

Obserwowane po podaniu badanych leków naczynioaktywnych zmniejszenie prozakrzepowego działania monocytów, przejawiające się zmniejszeniem uwalniania czynnika VII i X, prawdopodobnie ma związek, przynajmniej częściowo, z ich wpływem na proces zapalny. Stenson i wsp. [54] wykazali, że egzogenne PGE₂ hamuje adhezję, rozpościeranie oraz migrację makrofagów. Hanazawa i wsp. [23] stwierdzili, że podawanie pentoksyfiliny szczerom po wywołanej reperfuzji zapobiegało toczeniu się i przyleganiu leukocytów do śródbłonna. Mat-

The arterial walls and the atherosclerotic plaque of patients with PAOD contain large numbers of monocytes/macrophages, which are the source of coagulation factors [3, 14, 15, 19, 20]. Because of this, the beneficial effect of the study medicines may mainly be a result of their influence on local haemostasis regulation in the atherosclerotic vessels rather than their effect on intravessel haemostasis. Previous clinical studies, which investigated the effects of the studied drugs, did not show their significant influence on the plasma haemostasis parameters. Parnetti et al. [60], who used pentoxifylline in patients with PAOD, observed only a small decrease of factor VII activity in plasma, without significant changes in factor VII concentration. Pentoxifylline decreased fibrinogen concentration and stimulated fibrinolysis [52–53].

Conclusions

1. The carried out studies indicated that anti-atherosclerotic alprostadil and pentoxifylline activity might be, at least in part, connected with their influence on monocyte function.
2. None of the studied drugs had an influence on the ability of monocytes to release tissue factor.
3. Venous alprostadil and pentoxifylline infusion significantly inhibited procoagulation monocyte functions by the decreased factor VII and X release.

References

1. Ross R (1993) The pathogenesis of arteriosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801–809.
2. Ballou M (1989) Lymphocytes, monocytes, macrophages, and neutrophils. *J Allergy Clin Immunol*, 84: 1019–1023.
3. Osterud B, Lindhal U, Seljelid R (1980) Macrophages produce blood coagulation factors. *FEBS*, 120: 41–43.
4. Bailly S, Fay M, Ferrua B, Gougerot-Pocidal MA (1991) Ciprofloxacin treatment in vivo increases the ex vivo capacity of lipopolysaccharide-stimulated human monocytes to produce IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor- α . *Clin Exp Immunol*, 85: 331–334.
5. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P (2003) Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*, 107: 2829–2836.
6. Elias JA, Ferro TJ, Rossman MD et al (1987) Differential prostaglandin production by unfractionated and density-fractionated human monocytes and alveolar macrophages. *J Leukoc Biol*, 42: 114–121.
7. Hickman P, McCollum PT, Belch JF (1994) Neutrophils may contribute to the morbidity and mortality of claudicants. *Br J Surg*, 81: 790–798.
8. Kasahara K, Strieter RM, Chensue SW, Standiford TJ, Kunkel SL (1991) Mononuclear cell adherence induces neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 gene expression. *J Leukocyte Biol*, 50: 287–295.

sui i wsp. [32] uzyskali po dożylnym podaniu PGE₁ obniżenie stężenia MCP-1. Palumbo i wsp. [33], stosując PGE₁, uzyskali znaczącą redukcję stężenia krążących molekuł adhezyjnych (ICAM-1, E-selektyny, VCAM-1). Gianetti i wsp. [55], stosując PGE₁ u chorych na PAOD, obserwowali istotny spadek aktywności monocytów związany z obniżeniem stężenia VCAM-1. Alprostadil zmniejsza również stężenie endoteliny I w osoczu [56].

Jak wykazano we wcześniejsze badaniach, również pentoksyfilina zmniejsza aktywność leukocytów i monocytów [52–53]. Neuner i wsp. [57], badając działanie pentoksyfiliny *in vitro* i *in vivo*, obserwowali zmniejszenie ekspresji ICAM-1 na monocytach. Dosquet i wsp. [58] stwierdzili, że pentoksyfilina wpływa na zmniejszenie adhezji monocytów do komórek śródbłonna zarówno u osób zdrowych, jak i u chorych na cukrzycę. Rao i wsp. [59] stwierdzili, że stosowana przez 2 miesiące pentoksyfilina hamowała syntezę cytokin przez leukocyty u chorych na PAOD. Pentoksyfilina stymuluje również syntezę PGI₂ [50].

Wcześniejsze obserwacje innych autorów, jak również wyniki tej pracy wskazują na bezpośredni wpływ badanych leków na prokoagulacyjne i antykoagulacyjne funkcje monocytów. Crutchley i wsp. [31] wykazali, że PGE₁ jest fizjologicznym modulatorem ekspresji TF na monocytach.

Zarówno ściana naczynia tętniczego chorych na PAOD, jak i blaszka miażdżycowa zawiera duże ilości monocytów/makrofagów stanowiących źródło licznych czynników krzepnięcia [3, 14, 15, 19, 20]. W związku z tym korzystny efekt stosowanych leków może wynikać głównie z ich wpływu na regulację hemostazy lokalnej w obrębie zmienionych miażdżycowo naczyń, w mniejszym stopniu z ich wpływu na hemostazę wewnątrznacyniową. We wcześniejszych badaniach klinicznych, oceniających badane przez autorów niniejszej pracy leki, nie wykazano ich istotnego wpływu na parametry osoczowego układu krzepnięcia. Parnetti i wsp. [60], stosując doustną pentoksyfilinę u chorych na PAOD, obserwowali tylko niewielkie zmniejszenie aktywności czynnika VII w osoczu, bez istotnych zmian jego stężenia. Pentoksyfilina obniża stężenie fibrynogenu i stymuluje fibrynolizę [52–53].

Wnioski

1. Przeprowadzone badania wskazują, że przeciwmiażdżycowe działanie PGE₁ i pentoksyfiliny może mieć, przynajmniej częściowy, związek z ich wpływem na funkcje monocytów.
2. Żaden z badanych leków nie wpływał na zdolność monocytów do uwalniania TF.
3. Wlew dożylny PGE₁ i pentoksyfiliny hamuje znacząco prokoagulacyjną funkcję monocytów, zmniejszając uwalnianie czynnika VII i X.

9. Kennedy MS, Stobo JD, Goldyne ME (1980) In vitro synthesis of prostaglandins and related lipids by populations of human peripheral blood mononuclear cells. *Prostaglandins*, 20: 135–145.
10. Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ (1993) Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Jama*, 270: 975–979.
11. Schwartz BS, Monroe MC (1986) Human platelet aggregation is initiated by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide in vitro. *J Clin Invest*, 78: 1136–1141.
12. Setiadi H, Liote F, Wautier J (1986) Monocytes and vascular lesions. *Nouv Rev Fr Hematol*, 28: 339–343.
13. de Wall Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL 10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174: 1209–1220.
14. Levy GA, Edgington TS (1980) Lymphocyte cooperation is required for amplification of macrophage procoagulant activity. *J Exp Med*, 151: 1232–1244.
15. Van der Logt CPE, Dirven RJ, Reitsma PH, Rei Bertina RM (1994) Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. *Blood Coag Fibrinol*, 5: 211–220.
16. Morrissey JH, Fakhrizadeh H, Edgington TS (1987) Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell*, 50: 129–135.
17. Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT (1996) In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaque by binding of digoxigenin-labeled factor VIIa and X. *Lab Invest*, 75: 451–461.
18. Tremoli E, Camera M, Toschi V, Colli S (1999) Tissue factor in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 144: 273–283.
19. Capron L (1991) Leukocytes and arteriosclerosis. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 84: 1845–1850.
20. Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albada B, Homma S, Tullio MR (2002) Leukocyte count is associated with aortic arch plaque thickness. *Stroke*, 33: 2587–2592.
21. Annex BH, Denning SM, Channon KM et al (1995) Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation*, 91: 619–622.
22. Gosk-Bierska I, Adamiec R (2005) Czynnik tkankowy (TF) i jego inhibitor (TFPI) u pacjentów z miażdżycą – wstępne wyniki badań. *Acta Angiologica*, 11: 141–1.
23. Hanazawa S, Prewitt RL, Terzis JK (1994) The effect of Pentoxifylline on ischemia and reperfusion injury in the rat cremaster muscle. *J Reconstr Microsurg*, 10: 21–26.
24. Toschi V, Gallo R, Lettino M et al (1997) Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 95: 594–599.
25. Zeldis S, Nemerson Y, Pitlick R, Lentz T (1972) Tissue factor (thromboplastin): localization by peroxidase conjugated antibodies. *Science*, 175: 766–768.
26. McGee MP, Li LC, Hensler M (1992) Functional assembly of intrinsic coagulation proteases on monocytes and platelets. Comparison between cofactor activities by thrombin and factor Xa. *J Exp Med*, 176: 27–35.
27. Gordon S, Clarke S, Greaves D, Doule A (1995) Molecular immunobiology of macrophages: recent progress. *Curr Opin Immunol*, 7: 24–33.
28. Tracy PB, Rohrbach MS, Mann KG (1983) Functional prothrombinase complex assembly on isolated monocytes and lymphocytes. *J Biol Chem*, 258: 7264–7267.
29. Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR et al. (2000) A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med*, 109: 523–530.
30. Jawień A, Grzela T, Ciecierski M, Piotrowicz R, Szotkiewicz A, Migdalski A (2003) Buflomedil associated with pentoxifylline in the treatment of patients with intermittent claudication. Opened, randomized, one-centre-based study. *Acta Angiol*, 9: 109–122.
31. Crutchley DJ, Hirsh MJ (1991) The stable prostacyclin analog, iloprost, and Prostaglandin E1 inhibit monocyte procoagulant activity in vitro. *Blood*, 78: 382–386.
32. Matsui K, Ikeda U, Murakami Y, Yoshioka T, Shimada K (2003) Intravenous prostaglandin E1 reduces monocyte chemoattractant protein-1 level in peripheral arterial obstructive disease. *Am Heart J*, 145: 330–333.
33. Palumbo B, Oguogho A, Fitscha P, Sinzinger H (2000) Prostaglandin E1-therapy reduces circulating adhesion molecules (ICAM-1, E-selectin, VCAM-1) in peripheral vascular disease. *Vasa*, 29: 179–185.
34. de Prost D (1995) Pentoxifylline: a potential treatment for thrombosis associated with abnormal tissue factor expression by monocytes and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25 (suppl 2): S114–S118.
35. Weiss T, Eckstein H, Weiss C, Diehm C (1998) Neutrophil function in peripheral arterial occlusive disease: the effects of prostaglandin E1. *Vasc Med*, 3: 171–175.
36. Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest*, 97: 77–89.
37. Pawlowski NA, Abraham E, Hamill A, Scott WA (1984) The cyclooxygenase and lipooxygenase activities of platelet-depleted human monocyte. *J Allergy Clin Immunol*, 74: 324–330.
38. Swirsky DM (1984) Single incubation double esterase cytochemical reaction using a single coupling reagent. *J Clin Pathol*, 37: 1187–1190.
39. Creutzig A, Bullinger M, Cachovan M et al (1997) Improvement in the quality of life after iv PGE1 therapy for intermittent claudication. *Vasa*, 26: 122–127.
40. Incandela L, De Sanctis MT, Cesarone MR et al (2002) Short-range intermittent claudication and rest pain: microcirculatory effects of pentoxifylline in a randomized, controlled trial. *Angiology*, 53 (suppl 1): S27–S30.
41. De Sanctis MT, Cesarone MR, Belcaro G et al (2002) Treatment of intermittent claudication with pentoxifylline: a 12-month, randomized trial-walking distance and microcirculation. *Angiology*, 53 (suppl 1): S7–S12.
42. Scheffler P, de la Hamette D, Gross J, Mueller H, Schieffler H (1994) Intensive vascular training in stage IIb of peripheral arterial occlusive disease. The additive effects of intravenous prostaglandin E1 or intravenous pentoxifylline during training. *Circulation*, 90: 818–822.
43. Belcaro G, Nicolaidis AN, Cipollone G et al (2000) Nomograms used to define the short-term treatment with PGE1 in patients with intermittent claudication and critical ischemia. The ORACLE (Occlusion Revasculariza-

- tion in the Atherosclerotic critical Limb) Study Group. The European Study. *Angiology*, 51: S3–S13.
44. Makita S, Nakamura M, Ohira A, Itoh S, Hiramori K (1997) Effects of Prostaglandin E1 infusion on limb hemodynamics and vasodilatory response in patients with arteriosclerosis obliterans. *Cardiovasc Drugs Ther*, 11: 441–448.
 45. Milio G, Cospite V, Cospite M (2003) Effects of PGE-1 in patients suffering from peripheral arterial occlusive disease. *Minerva Cardioangiol*, 51: 311–316.
 46. Lee TM, Su SF, Tsai CH, Lee YT, Wang SS (2001) Differential effects of cilostazol and pentoxifylline on vascular endothelial growth factor in patients with intermittent claudication. *Clin Sci*, 101: 305–311.
 47. Sanctis MT, Cerasone MR, Belcaro G et al (2002) Treatment of long-distance intermittent claudication with pentoxifylline: a 12-month, randomized trial. *Angiology*, 53 (suppl 1): 13–17.
 48. Cesarone MR, Belcaro G, Nicolaidis AN et al (2002) Treatment of severe intermittent claudication with pentoxifylline: a 40-week, controlled, randomized trial. *Angiology*, 53 (suppl 1): 1–5.
 49. Rucińska M, Gacko M, Skrzydlewski Z (1997) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI). *Rocz Akad Med Białystok* 42 (suppl 1): 118–122.
 50. Poggesi L, Scarti L, Boddi M, Masotti G, Sernerri G (1985) Pentoxifylline treatment in patients with occlusive peripheral arterial disease. Circulatory changes and effects on prostaglandin synthesis. *Angiology*, 36: 628–637.
 51. Trubestein G, von Bary S, Breddin K et al (1989) Intravenous prostaglandin E1 versus pentoxifylline therapy in chronic arterial occlusive disease—a controlled randomised multicenter study. *Vasa Suppl*, 28: 44–49.
 52. Maj Curt P, Samlaska, MC, F.A.C.P, and CPT Elizabeth A, Winfield MC (1994) Pentoxifylline. *J Am Acad Derm*, 30: 603–621.
 53. Janczarek B (1999) Wpływ leków naczynioaktywnych na odkształcalność monocytów u chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych. Praca na stopień doktora nauk medycznych. Biblioteka AM, Białystok.
 54. Stenson WF, Parker CW (1980) Prostaglandins, macrophages and immunity. *J Immunol*, 125: 1–5.
 55. Gianetti J, De Caterina M, De Cristofaro T, Ungaro B, Guercio RD, De Caterina R (2001) Intravenous prostaglandin E1 reduces soluble vascular cell adhesion molecule-1 in peripheral arterial obstructive disease. *Am Heart J*, 142: 733–739.
 56. Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito M et al (1999) Effects of a 4 week treatment with prostaglandin E1 on plasma endothelin 1 release in patients with intermittent claudication. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 37: 347–351.
 57. Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, Knobler R, Schwarz T (1997) Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology*, 90: 435–439.
 58. Dosquet C, Weill D, Wautier JL (1992) Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Hematol*, 34 (suppl): S55–S59.
 59. Rao KM, Simel DL, Cohen HJ, Crawford J, Currie MS (1990) Effects of pentoxifylline administration on blood viscosity and leukocyte cytoskeletal function in patients with intermittent claudication. *Lab Clin Med*, 115: 738–744.
 60. Parnetii L, Mari D, Abate G et al (1997) Vascular dementia Italian sulodexide study (VA.D.I.S.S.). Clinical and biological results. *Thromb Res*, 87: 225–233.