

Лунёва А.Г., Кривенко Е.А.

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика,
Киев, Украина

Luneva A., Kryvenko E.

Shupyk National Medical Academy of Post-Graduate Education, Kiev, Ukraine

Продукция провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-17) и уровни их содержания в сыворотке крови пациентов с хроническим гломерулонефритом

Production of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-17) and their concentration in serum of patients with chronic glomerulonephritis

Резюме

В статье представлены сравнительные данные спонтанной и индуцированной митогеном фитогемагглютином цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров цельной крови и изменения уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке крови здоровых и больных хроническим гломерулонефритом со II и III стадиями хронической болезни почек (ХБП). Установлено, что продукция провоспалительного цитокина ФНО- α снижается в супернатантах и сыворотке крови у больных с III стадией ХБП.

Уровни же ИЛ-17 хотя и значительно выше показателей контрольной группы, существенно не отличаются у больных со II и III стадиями ХБП. Средние значения ИЛ-1 β существенно не отличаются от показателей контрольной группы; различия его уровней в сыворотке крови при II и III стадиях ХБП недостоверны. Высокие уровни ИЛ-17 и снижение уровней ФНО- α в III стадии ХБП может свидетельствовать о функциональном истощении мононуклеарных клеток и увеличении площади склероза и фиброза в почке.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, хроническая почечная недостаточность, хроническая болезнь почек, цитокины, мононуклеары, интерлейкины.

Resume

Comparative data about spontaneous and induced by phytohemagglutinin mitogen (PHA) cytokine producing ability of blood mononuclear cells and changes of the proinflammatory cytokines concentration in serum of healthy men and in serum of patients with chronic glomerulonephritis in II and III stages of chronic kidney disease (CKD) are reviewed in the article. It was found that the

production of proinflammatory cytokine TNF- α in supernatants and in serum reduces in patients with stage III of CKD. Although the concentration of IL-17 is significantly higher than in the control group, it doesn't differ significantly in patients with stages II and III of CKD. The mean values of IL-1 β doesn't differ significantly from the control group, and the difference of its levels in II and III stages of chronic kidney disease is not reliable. High levels of IL-17 and decreased levels of TNF- α in stage III of CKD may be the indicators of a functional depletion of mononuclear cells and the increasing of sclerosis area and fibrosis in kidney.

Key words: chronic glomerulonephritis, chronic renal failure, chronic kidney disease, cytokines, mononuclear cells, interleukins.

■ ВВЕДЕНИЕ

Болезни почек занимают одно из ведущих мест в общей структуре заболеваемости и являются социально значимой проблемой из-за увеличения больных среди молодого и трудоспособного населения. В последнее время наблюдаются изменение возрастного состава пациентов, более быстрое и тяжелое течение, прогрессирование и повышение резистентности к традиционной терапии [1].

Хронический гломерулонефрит (ХГН) занимает третье место среди заболеваний почек и является неуклонно прогрессирующим заболеванием, которое ведет к развитию хронической почечной недостаточности (ХПН). Поэтому существует необходимость приостановить прогрессирование ХГН и отсрочить развитие ХПН, которая нуждается в лечении внепочечными методами очищения крови и пересадке почки [2].

ХПН – это синдром, обусловленный необратимым, преимущественно прогрессирующим повреждением почки, одними из проявлений которого являются повышение концентрации креатинина в сыворотке крови и снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ). По показателю СКФ определяется степень нарушения почечной функции и стадия хронической болезни почек (ХБП). Существует 5 стадий ХБП: I – поражение почек с нормальной или повышенной СКФ (≥ 90 мл/мин/1,73м²); II – умеренное снижение СКФ (60–89 мл/мин/1,73м²); III – средняя степень снижения СКФ, начальная почечная недостаточность (30–59 мл/мин/1,73м²); IV – значительная степень снижения СКФ, выраженная почечная недостаточность (15–29 мл/мин/1,73м²); V – терминальная почечная недостаточность (< 15 мл/мин/1,73м²) [3].

В последнее время широко обсуждается цитокиновая теория патогенеза ХГН. Важную роль в развитии ХГН и ХПН играют противовоспалительные и провоспалительные цитокины. Противовоспалительные цитокины отвечают за остановку воспалительных реакций, а провоспалительные, наоборот, формируют их возникновение. Преимущество тех или иных групп цитокинов в очаге воспаления дает ответ, соответствующий характеру процесса, его тяжести, длительности и дальнейшему развитию. Если в очаге воспаления преобладают противовоспалительные цитокины, то происходит прекращение воспаления или попытка его ограничения. Кроме запуска самого воспаления, провоспалительные цитокины приводят к их дополнительному выбросу, а также к выбросу других медиаторов воспаления [4].

Действие цитокинов на клетки осуществляется: аутокринно – на клетки, которые секретируют данный цитокин; паракринно – на клетки вокруг секретирующей клетки; эндокринно-дистанционно – на клетки любых других органов и тканей после попадания цитокинов в циркулирующее русло крови. Образование и высвобождение цитокинов – это кратковременный и жестко регулируемый процесс; характерным является и то, что продукция одного цитокина влияет на активность ряда других [5].

Цитокины являются локальными медиаторами, поэтому имеет смысл определять их уровни в биологических жидкостях (сыворотка, моча, плазма, цереброспинальная и синовиальная жидкости и др.). Дополнительную информацию о состоянии иммунной системы можно получить при исследовании свойства клеток крови к продукции цитокинов *in vitro*. При исследовании *in vitro* удачной моделью являются мононуклеары, преимущественно за счет их доступности (для исследования можно использовать цельную кровь). Уровни цитокинов в сыворотке крови отображают текущее функциональное состояние иммунной системы и развитие защитных реакций, отражающее синтез цитокинов клетками организма *in vivo*. Определение уровней цитокинов *in vitro* показывает функциональное состояние клеток [6].

Спонтанная продукция цитокинов мононуклеарами в культуре позволяет оценить состояние соответствующих клеток. Увеличение спонтанной продукции цитокинов свидетельствует о том, что клетки активированы антигеном *in vivo*. Индуцированная продукция позволяет судить о потенциальных возможностях активированных клеток отвечать на антигенную стимуляцию, то есть определить иммунологическую реактивность [7].

■ ЦЕЛЬ

Изучение *in vitro* спонтанной и индуцированной митогеном фитогемагглютином (ФГА) продукции мононуклеарными клетками цельной крови провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-17), а также изменение их уровней в сыворотке крови у больных ХГН с II и III стадиями ХБП и здоровых доноров.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров явились гепаринизированная цельная кровь и сыворотка 30 здоровых доноров и 129 больных ХГН, среди которых 69 – со II и 60 с III стадиями ХБП, так как при III стадии ХБП выявляют начальные признаки почечной недостаточности.

Мононуклеарные клетки цельной крови в количестве $1,5 \times 10^6$ кл/мл выделяли на стандартном градиенте фиколл-верографин (1,076–1,078), инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в питательной среде RPMI-1640 в течение 24 ч (спонтанная продукция) с добавлением митогена ФГА (Sigma, США) в количестве 30 мкл (стимулированная продукция). После инкубации клетки осаждались на микроцентрифуге при 1,5 тыс. об./мин в течение 10 мин. Полученный осадок супернатанта переносили в полипропиленовые пробирки «Эппендорф», заморозивали и сохраняли при –20 °С до момента тестирования.

Для проведения иммунологических исследований сыворотки крови у пациентов брали кровь из вены в количестве 10–12 мл. Взятие крови производилось натощак после 15-минутного отдыха. Полученные образцы крови отстаивали в течение 30–60 мин в термостате при 37 °С до формирования фибринового сгустка, после чего кровь центрифугировали при 1,5 тыс. об./мин в течение 20 мин. Далее сыворотку крови переносили в полипропиленовые пробирки «Эппендорф», замораживали и сохраняли при –20 °С до момента тестирования.

Определение уровней провоспалительных цитокинов в супернатанте и сыворотке крови проводили иммуноферментным методом на ИФА-анализаторе STATFAX 303 Plus (США) в соответствии с инструкцией производителей тест-систем «Нусcult biotechnology» (Нидерланды) и ТОВ «Укрмед Дон» (Украина).

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили с помощью компьютерных программ EXCEL и BioStat.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного *in vitro* исследования по изменению спонтанной и стимулированной продукции провоспалительных цитокинов в супернатантах здоровых доноров и больных ХГН со II и III стадиями ХБП представлены в табл. 1, изменение уровней провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-17 в сыворотке крови – в табл. 2.

Результаты оценки спонтанной и стимулированной продукции мононуклеарными клетками провоспалительных цитокинов показали

Таблица 1

Спонтанная и стимулированная митогеном ФГА продукция провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-17 мононуклеарными клетками во II и III стадии хронической болезни почек (Х+5х)

Цитокины, нг/л	Контрольная группа, n=30	II стадия ХБП, n=69	III стадия ХБП, n=60			
	спонтанная	стимулированная	спонтанная	стимулированная	спонтанная	стимулированная
ФНО- α	25,5 \pm 2,5	156,2 \pm 4,9	71,4 \pm 6,8*	157,3 \pm 14,5*	56,1 \pm 5,1*	123,6 \pm 10,8*
ИЛ-1 β	40,5 \pm 4,0	78,4 \pm 7,3	52,6 \pm 4,9*	101,9 \pm 10,0*	49,3 \pm 4,3*	94,5 \pm 9,0*
ИЛ-17	3,7 \pm 0,3	8,2 \pm 0,8	10,75 \pm 0,95*	23,5 \pm 2,1*	11,5 \pm 1,0*	25,42 \pm 2,3*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

Таблица 2

Уровни провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-17 в сыворотке крови здоровых доноров и больных ХГН при II и III стадии хронической болезни почек (Х+5х)

Цитокины, нг/л	Контрольная группа, n=30	II стадия ХБП, n=69	III стадия ХБП, n=60
ФНО- α	24,4 \pm 2,2	69,61 \pm 6,1*	53,25 \pm 4,9*
ИЛ-1 β	48,9 \pm 4,0	62,68 \pm 5,5	60,91 \pm 4,8
ИЛ-17	6,6 \pm 0,58	19,19 \pm 1,88*	20,03 \pm 1,8*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

достоверное ($p < 0,05$) увеличение уровней ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-17 как при II (спонтанная – $71,4 \pm 6,8$; $52,6 \pm 4,9$; $10,75 \pm 0,95$ и стимулированная – $157,3 \pm 14,5$; $101,9 \pm 10,0$; $11,5 \pm 1,0$ нг/л), так и при III (спонтанная – $56,1 \pm 5,1$; $49,3 \pm 4,3$; $11,5 \pm 1,0$ и стимулированная – $123,6 \pm 10,8$; $94,5 \pm 9,0$; $25,42 \pm 2,3$ нг/л) стадиях ХБП. Следует отметить, что уровень ФНО- α значительно снизился в III стадии ХБП по сравнению со II, а уровни ИЛ-1 β и ИЛ-17 существенно не отличались.

Таким образом, можно предположить, что снижение уровня ФНО- α в III стадии ХБП свидетельствует о более выраженных процессах склерозирования и фиброзирования почечной ткани, а с учетом хронического течения гломерулонефрита и отсутствия изменений уровней ИЛ-1 β и ИЛ-17 при II и III стадиях ХБП – о функциональном истощении мононуклеаров.

Результаты, полученные при проведении исследования, свидетельствуют о достоверном ($p < 0,05$) повышении уровней ФНО- α и ИЛ-17 при II ($69,61 \pm 6,1$ и $19,19 \pm 1,88$ пг/мл) и III ($53,25 \pm 4,9$ и $20,03 \pm 1,8$ нг/л) стадиях ХБП в сыворотке крови у больных с ХГН при сравнении с контрольной группой ($24,4 \pm 2,2$; $6,6 \pm 0,58$ нг/л). Уровни ИЛ-1 β изменялись статистически недостоверно ($p > 0,05$) как у больных со II ($62,68 \pm 5,5$ нг/л), так и у больных III ($60,91 \pm 4,8$ нг/л) стадиями ХБП по сравнению с больными контрольной группы ($48,9 \pm 4,0$ нг/л). При сравнении уровней цитокинов у пациентов со II и III стадиями заболевания получена разница уровней ФНО- α в пользу больных со II стадией; уровни ИЛ-17 существенно не отличались.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень ФНО- α выше в 2,5 и 2 раза при II и III стадиях ХБП соответственно; ИЛ-1 β – в 1,5 раза и ИЛ-17 – в 3 раза в обеих группах больных по сравнению с контрольной.

Полученные результаты свидетельствуют о более выраженном процессе фиброзирования и склерозирования почечной ткани при III стадии ХБП, на что указывают высокие уровни ИЛ-17 и значительное снижение уровней ФНО- α .

■ ВЫВОДЫ

1. Продукция *in vitro* ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-17 в супернатантах больных ХГН как со II, так и с III стадиями значительно выше, чем в контрольной группе, особенно при стимуляции митогеном ФГА, что свидетельствует о повышенной активности мононуклеарных клеток.
2. Уровни ФНО- α и ИЛ-17 достоверно выше в сыворотке крови при II и III стадиях ХБП по отношению к аналогичным показателям в контрольной группе, что свидетельствует о длительном хроническом процессе с выраженным поражением почечной ткани.
3. Снижение продукции ФНО- α в III стадии ХБП при спонтанной и индуцированной продукции мононуклеарами может указывать на функциональное истощение мононуклеарных клеток.
4. Снижение продукции ФНО- α в сыворотке крови при III стадии ХБП сопоставимо с увеличением объема склероза и фиброза почки.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Колесник, М.О. Медико-профілактична допомога хворим нефрологічного профелю у 2005 в Україні / М.О. Колесник, Н.О. Сайдакова // Укр. журнал нефрології та діалізу. – 2006. – № 4. – С. 21–40.
2. Колесник М.О. Основи нефрології / за ред.. М.О. Колесніка.– Київ : Здоров'я України. – 2010. – 380 с.
3. Корякова, Н.Н. Особенности цитокинового профиля у больных хроническим гломеруло-нефритом с прогрессирующей хронической почечной недостаточностью / Н.Н. Корякова, Е.Д. Рождественская, С.В. Казанцева [и др.] // Терапевтический архив. – 2006. – № 5. – С. 14–17.
4. Топчій, І.І. Порушення секреції прозапальних цитокінів у хворих на хронічний гломеруло-нефрит та хронічний пієлонефрит / І.І. Топчій, В.Ю. Гальчинська, П.С. Семенових // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2009. – № 3(23). – С. 3–5.
5. Русалов, В.Л., Салманова, О.Н., Рябенко, Э.Б., Никитенко, Н.А. Секреторная активность интактных Т-лимфоцитов // Укр. мед. альманах. – 2009. – Т. 12. – № 2. – С. 147–148.
6. Стериони, И.В. Секреторная активность интактных моноцитов in vitro / И.В. Стериони // Укр. мед. альманах. – 2009. – № 1. – С. 157–158.
7. Рыжикова, С.Л., Дружинина, Ю.Г., Рябичева, М.Ю. [и др.] Новый набор реагентов для культивирования и митогенной активации клеток цельной крови // Новости «Вектор-Бест». – 2009. – № 4 (54).

Поступила в редакцию 28.05.2013

Контакты:

e-mail: ganna.lunyova@gmail.com

Лунёва Анна Геннадьевна – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика