

Лунева А.Г., Кривенко Е.А.

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

# Изменение спонтанной и индуцированной продукции провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ и ИЛ-17) мононуклеарными клетками цельной крови у больных хроническим гломерулонефритом

УДК 616-002-036.12-097

Поступила в редакцию 01.06.2012 г.

Контакты:

e-mail: Ganna.Lunyova@gmail.com

---

## Резюме

---

В работе представлены результаты сравнения спонтанной и индуцированной митогеном ФГА (фитогемагглютинин) цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров цельной крови здоровых и больных хроническим гломерулонефритом как без указания морфологических форм, так и при распределении на пролиферативные и непролиферативные морфологические формы. Установлено, что продукция (спонтанная и стимулированная) провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 у больных хроническим гломерулонефритом достоверно увеличивается так же, как и у больных с пролиферативными и непролиферативными формами хронического гломерулонефрита.

**Ключевые слова:** хронический гломерулонефрит, пролиферативный и непролиферативный гломерулонефрит, цитокины, мононуклеары.

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

В последнее время интерес к исследованию процессов регуляции системы цитокинов возрос в связи с расширением представлений о функциональной активности иммуннокомпетентных клеток, в частности касающихся их способности продуцировать цитокины, обеспечивающие межклеточное взаимодействие.

Т-хелперы I типа продуцируют интерлейкины ИЛ-2, 3, 4, 5, 6, 10, а Т-хелперы II типа – ИЛ-3, 4, 5, 6, 10 [1, 2].

Важное значение приобретает изучение двух типов Т-хелперов, которые отличаются набором секретируемых цитокинов – Т-хелперы I типа и Т-хелперы II типа.

Одни из наиболее важных цитокинов, продуцируемых моноцитами и макрофагами, – ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, 3, 6, 8, 10, 12, 15, 17 и др. ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 запускают весь каскад продукции цитокинов и являются обязательными участниками развития специфических и неспецифических иммунных реакций. Поэтому главными индикаторами активности мононуклеаров и макрофагов считают ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 [3–5].

Изменение продукции цитокинов может быть фактором риска дальнейших нарушений в каскаде иммунных реакций, которые приводят к развитию хронической патологии и дальнейшему прогрессированию заболевания [5, 6].

Хронический гломерулонефрит (ХГН) является именно тем заболеванием, которое сопровождается изменением цитокинового профиля и требует своевременной диагностики и определения скорости развития патологического процесса. Поскольку на сегодняшний день ХГН – довольно распространенное заболевание, особенно у лиц молодого возраста, возникла необходимость изучения новых механизмов, обеспечивающих прогрессирование ХГН, с целью поиска путей предупреждения прогрессирования. Изучение спонтанной и стимулированной продукции цитокинов мононуклеарами *in vitro* позволяет оценить функциональную активность клеток крови и их потенциальную возможность к продукции цитокинов у больных ХГН [7].

## ■ ЦЕЛЬ

Изучить *in vitro* спонтанной и индуцированной митогеном фитогемагглютинин продукции мононуклеарными клетками цельной крови провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-17) у больных хроническим гломерулонефритом и здоровых доноров.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров была гепаринизированная цельная кровь 30 здоровых доноров и 129 больных ХГН. Мононуклеарные клетки (кл) цельной крови в количестве  $1,5 \times 10^6$  кл/мл выделяли на стандартном градиенте плотности фиколл-верографин (1,076–1,078), инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C в питательной среде RPMI-1640 в течение 24 часов (спонтанная продукция) и с добавлением митогена ФГА (Sigma, США) в количестве 30 мкл (стимулированная продукция). После инкубации клетки осаждались на микроцентрифуге со скоростью 1,5 тыс. об/мин в течение 10 минут. Полученный осадок супернатанта переносили в полипропиленовые пробирки «Эппендорф», замораживали и сохраняли при –20°C до момента тестирования. Определение уровней провоспалительных цитокинов в супернатантах проводили иммуноферментным методом на ИФА-анализаторе STATFAX 303 Plus (США) в соответствии к инструкциям производителей тест-систем «Nuncult biotechnology» (Нидерланды) и ТОВ «Укрмед Дон» (Украина). Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили с помощью компьютерных программ «Excel» и «BioStat».

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные *in vitro* исследования спонтанной и стимулированной продукции провоспалительных цитокинов в супернатантах здоровых доноров и больных ХГН без указания морфологических форм и при распределении на пролиферативные и непролиферативные формы представлены в табл. 1 и 2.

Полученные при проведении исследования результаты показали достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение уровня ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 у больных ХГН при спонтанной ( $63,75 \pm 5,8$ ;  $48,6 \pm 4,3$  и  $11,0 \pm 0,97$  нг/л) и особенно стимулированной митогеном ФГА ( $140,0 \pm 11,2$ ;  $94,1 \pm 8,7$  и  $25,42 \pm 2,3$  нг/л) в сравнении с данными контрольной группы ( $25,5 \pm 2,5$ ;  $40,5 \pm 4,0$ ;  $3,7 \pm 0,3$  и  $56,2 \pm 4,9$ ;  $78,4 \pm 7,3$ ;  $8,2 \pm 0,8$  нг/л).

Результаты, полученные при проведении исследования, свидетельствуют о достоверном ( $p < 0,05$ ) повышении уровней ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 при спонтанной продукции мононуклеарными клетками у больных как с пролиферативными ( $79,1 \pm 6,5$ ;  $60,75 \pm 5,8$ ,  $10,7 \pm 1,0$  нг/л), так и с непролиферативными ( $53,5 \pm 5,0$ ;  $44,5 \pm 4,1$ ;  $10,1 \pm 0,88$  нг/л) формами ХГН. Стимулированная митогеном ФГА продукция провоспалительных цитокинов была значительно ( $p < 0,05$ ) выше и при пролиферативных ( $174,2 \pm 16,8$ ;  $117,6 \pm 10,3$ ;  $23,78 \pm 2,0$  нг/л), и при непролиферативных ( $118,2 \pm 10,5$ ;  $86,2 \pm 7,6$ ;  $21,5 \pm 1,88$  нг/л) формах ХГН.

Установлено, что ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  являются провоспалительными цитокинами «первой волны», которые запускают продукцию других цитокинов и медиаторов воспаления и которые обязательно участвуют в развитии специфических и неспецифических иммунных реакций. Именно поэтому ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  принято считать главными индикаторами активности моноцитов и макрофагов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о более выраженной активности мононуклеаров у больных ХГН, так как по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы уровень ФНО- $\alpha$  оказался выше в 2,5 раза, а ИЛ-1 $\beta$  – в 1,5 раза.

Продукция ИЛ-17 осуществляется под влиянием ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ . Одной из его способностей является индуцирование разрушения ткани при аутоиммунных заболеваниях, в том числе и при ХГН. При исследовании было установлено повышение его уровня у больных с ХГН в 3 раза по сравнению с таковым у здоровых доноров.

При сравнении морфологических групп средние значения показателей ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  были статистически достоверно ( $p < 0,001$ ) выше у больных с пролиферативными формами, а уровни ИЛ-17 существенно не отличались ( $p > 0,05$ ).

Таблица 1

Концентрация провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 в супернатанте при спонтанной и индуцированной митогеном ФГА продукции (M + m)

| Цитокины, нг/л | Здоровые (контрольная группа), n = 30 |                                     | Больные с ХГН, n = 129         |                                     |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
|                | Спонтанная продукция цитокинов        | Стимулированная продукция цитокинов | Спонтанная продукция цитокинов | Стимулированная продукция цитокинов |
| ФНО- $\alpha$  | 25,5 ± 2,5                            | 56,2 ± 4,9                          | 63,75 ± 5,8*                   | 140,0 ± 11,2*                       |
| ИЛ-1 $\beta$   | 40,5 ± 4,0                            | 78,4 ± 7,3                          | 48,6 ± 4,3*                    | 94,1 ± 8,7*                         |
| ИЛ-17          | 3,7 ± 0,3                             | 8,2 ± 0,8                           | 11,0 ± 0,97*                   | 25,42 ± 2,3*                        |

Примечание:

\* –  $p < 0,05$  при сравнении с показателями пациентов контрольной группы.

**Таблица 2**

**Спонтанная и стимулированная митогеном ФГА продукция ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 в супернатантах больных с пролиферативными и непролиферативными формами ХГН (M + m)**

| Цитокины, нг/л | Здоровые (контрольная группа), n = 30 |                                     | Больные с пролиферативным ХГН, n = 37 |                                     | Больные с непролиферативным ХГН, n = 92 |                                     |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
|                | Спонтанная продукция цитокинов        | Стимулированная продукция цитокинов | Спонтанная продукция цитокинов        | Стимулированная продукция цитокинов | Спонтанная продукция цитокинов          | Стимулированная продукция цитокинов |
| ФНО- $\alpha$  | 25,5 $\pm$ 2,5                        | 156,2 $\pm$ 4,9                     | 79,1 $\pm$ 6,5*                       | 174,2 $\pm$ 16,8*                   | 53,5 $\pm$ 5,0*                         | 118,2 $\pm$ 10,5*                   |
| ИЛ-1 $\beta$   | 40,5 $\pm$ 4,0                        | 78,4 $\pm$ 7,3                      | 60,75 $\pm$ 5,8*                      | 117,6 $\pm$ 10,3*                   | 44,5 $\pm$ 4,1*                         | 86,2 $\pm$ 7,6*                     |
| ИЛ-17          | 3,7 $\pm$ 0,3                         | 8,2 $\pm$ 0,8                       | 10,7 $\pm$ 1,0*                       | 23,78 $\pm$ 2,0*                    | 10,1 $\pm$ 0,88*                        | 21,5 $\pm$ 1,88*                    |

Примечание:

\*– p < 0,05 при сравнении с данными пациентов контрольной группы.

При изучении пролиферативных форм ХГН было выявлено повышение уровней ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 в 3, 1,5 и 3 раза соответственно. При непролиферативных формах заболевания происходит увеличение концентрации ФНО- $\alpha$  и ИЛ-17 в 2 и 3 раза соответственно, тогда как в уровне ИЛ-1 $\beta$  изменений не наблюдалось. Средние значения концентрации ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  были выше у больных с пролиферативными формами заболевания, а концентрация ИЛ-17 повышалась одинаково в обеих морфологических группах.

Следовательно, полученные данные свидетельствуют о более значительном поражении ткани почек именно у больных с пролиферативными формами ХГН.

Дальнейшим этапом исследования было изучение изменения уровня провоспалительных цитокинов в зависимости от функционального состояния почки, то есть у больных со II и III стадиями хронической болезни почек (ХБП) (табл. 3).

Результаты определения спонтанной и стимулированной продукции мононуклеарными клетками провоспалительных цитокинов показали статистически достоверное (p < 0,05) увеличение уровней ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 как при II (спонтанная продукция цитокинов – 71,4  $\pm$  6,8; 52,6  $\pm$  4,9; 10,75  $\pm$  0,95 и стимулированная продукция цитокинов – 157,3  $\pm$  14,5; 101,9  $\pm$  10,0; 11,5  $\pm$  1,0 нг/л), так и при III (спонтанная продукция цитокинов – 56,1  $\pm$  5,1; 49,3  $\pm$  4,3; 11,5  $\pm$  1,0 и стимулированная продукция цитокинов – 123,6  $\pm$  10,8; 94,5  $\pm$  9,0; 25,42  $\pm$  2,3 нг/л) стадии ХБП. Следует отметить, что уровень ФНО- $\alpha$  значительно снизился в III стадии ХБП по сравнению с аналогичными значениями у пациентов со II стадией, а уровни ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 существенно не отличались.

Таким образом, можно предположить, что снижение уровня ФНО- $\alpha$  в III стадии ХБП свидетельствует о более выраженных процессах склерозирования и фиброзирования почечной ткани. Хроническое течение гломерулонефрита и констатация отсутствия изменений в уровне ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 во II и III стадиях ХБП позволяет судить о функциональном истощении мононуклеаров.

Таблица 3

Спонтанная и стимулированная митогеном ФГА продукция провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 мононуклеарными клетками во II и III стадии хронической болезни почек (M + m)

| Цитокины, нг/л | Здоровые (контрольная группа), n = 30 |                                     | Пациенты со II стадией ХБП, n = 69 |                                     | Пациенты с III стадией ХБП, n = 60 |                                     |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|                | Спонтанная продукция цитокинов        | Стимулированная продукция цитокинов | Спонтанная продукция цитокинов     | Стимулированная продукция цитокинов | Спонтанная продукция цитокинов     | Стимулированная продукция цитокинов |
| ФНО- $\alpha$  | 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 $\beta$   | 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 показателями у пациентов контрольной группы.

## ■ ВЫВОДЫ

1. Установление значительно более высокой концентрации ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-17 в биологическом материале больных хроническим гломерулонефритом (особенно при стимуляции митогеном ФГА) по сравнению с аналогичными показателями у представителей контрольной группы (здоровых лиц) свидетельствует о повышенной активности мононуклеарных клеток.
2. Констатация у больных с пролиферативными формами хронического гломерулонефрита более высоких уровней ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  свидетельствует о более обширном поражении почечной ткани.
3. Снижение продукции ФНО- $\alpha$  в III стадии ХБП может свидетельствовать о значительном объеме склерозирования и фиброзирования почек.

## Resume

Luneva A.G., Kryvenko E.A.

National Medical Academy of Post-Graduate Education named after P.L. Shupyk, Kiev, Ukraine

# Change of spontaneous and induced production of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-17) of whole blood mononuclear cells in patients with chronic glomerulonephritis

The paper presents the results of a comparison of spontaneous and induced mitogen PHA production of cytokines whole blood mononuclear cells of healthy and patients with chronic

glomerulonephritis, as without the morphological forms, and when divided by proliferative and nonproliferative morphological forms. It is established that the products (spontaneous and stimulated) inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-17 in patients with chronic glomerulonephritis was significantly increased, as well as in patients with proliferative and nonproliferative forms of chronic glomerulonephritis.

**Key words:** chronic glomerulonephritis, proliferative, nonproliferative, cytokines, mononuclear cells.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Дранник, Г.Н., Курченко, А.И., Фесенкова, В.Й. [и др.]. Изучение влияния препаратов класса эрбисол на продукцию цитокинов мононуклеарами периферической крови здоровых доноров и онкологических больных // Фармакологія та фармація. – 2006. – № 7.
2. Фесенкова, В.Й., Дранник, Г.М., Дряньська, В.Є. [та ін.] Дослідження *in vitro* впливу препаратів Ербісол на продукцію інтерлейкіну-2 та  $\gamma$ -інтерферону Т-хелперами I типу здорових донорів // Лабораторная діагностика. – 2003. – № 2. – С. 37–40.
3. Русалов, В.Л., Салманова, О.Н., Рябенко, Э.Б., Никитенко, Н.А. Секреторная активность интактных Т-лимфоцитов // Украинский медицинский альманах. – 2009. – Т. 12. – № 2. – С. 147–148.
4. Стериони, И.В. Секреторная активность интактных моноцитов *in vitro* / И.В. Стериони // Украинский медицинский альманах. – 2009. – № 1. – С. 157–158.
5. 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).
6. Маркелова, Е.В., Костюшко, А.В., Красников, В.Е. Патогенетическая роль нарушений в системе цитокинов при инфекционно-воспалительных заболеваниях // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 24–29.
7. Бурмистрова, А.Л., Филиппова, Ю.Ю., Угнивенко, М.И. [и др.]. Оценка бактерицидной активности и секреции цитокинов лейкоцитами периферической крови на ранней стадии развития ожоговой болезни // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – Т. 12. – № 1 (7). – С. 1722–1725.