

© Гайсенюк Ф.З., 2015

УДК 616.6-002.2-036-097

ГАЙСЕНЮК Ф.З.

ЕКСПРЕСІЯ МОЛЕКУЛ МІЖКЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ (CD54+) НА ЛІМФОЦИТАХ ТА РІВЕНЬ ПРО- І ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ХВОРИХ НА ПІЄЛОНЕФРИТ

GAYSENYUK F.Z.

EXPRESSION OF INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE (ICAM-1) ON LYMPHOCYTES AND THE LEVELS OF PRO- AND ANTIINFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH PYELONEPHRITISКНМАПО ім. Шупика, кафедра урології;
ДУ «Інститут нефрології НАМНУ», м. Київ*National Medical Academy of Postgraduate Education name P. L. Shupyk,
SI "Institute of Nephrology NAMS of Ukraine"***Ключевые слова:** CD54+-лимфоциты, цитокины, острый и хронический пиелонефрит.**Key words:** CD54+-lymphocytes, cytokines, acute and chronic pyelonephritis.**Резюме.** Цель работы – исследование уровней моноклеарных клеток, экспрессирующих молекулы межклеточной адгезии (CD54+), а также про- и противовоспалительных цитокинов крови у больных пиелонефритом (ПН), установить особенности при остром и хроническом его течении.**Материалы и методы.** Уровень цитокинов изучали с помощью иммуноферментного метода ELISA и соответствующих тест-систем ("Diaclone", "DRG"), а CD54+-клеток – иммунофлуоресцентного с использованием "Coltage" (США).**Результаты.** У больных острым и хроническим пиелонефритом выявлено достоверное повышение числа CD54+-клеток крови на фоне высоких уровней ИЛ-1, ФНО-α, ИЛ-4 и ТФР-β в сыворотке крови. Больные ХПН характеризовались наиболее высокой экспрессией молекул CD54 и уровня ТФР-β.**Заключение.** Высокие показатели цитокинов и CD54+-лимфоцитов подтверждают их важную роль в иммуногенезе пиелонефрита, особый интерес представляет обнаруженная взаимосвязь между уровнями CD54+-клеток и ТФР-β при хроническом процессе.**Summary.** The aim of this work is to investigate the level of mononuclear cells, expressing intercellular adhesion molecule (CD54+), pro- (IL-1, TNF-α) and antiinflammatory (IL-4, TGF-β) blood cytokines in the patients with pyelonephritis PN, to determine the peculiarities in acute and chronic its course.**Materials and methods.** The immuno-enzymic method ELISA and the corresponding test-systems ("Diaclone", "DRG") were used to study the levels of blood cytokines and immuno-fluorescent with "Coltage" (USA) – the level of CD54+-cells.**Results.** It has been demonstrated that CD54+-lymphocytes, IL-1, TNF-α, IL-4 and TGF-β in blood were increased in patients with acute and chronic pyelonephritis, compared with healthies. The number of lymphocytes expressing CD54 and the level of TGF-β were higher in patients with chronic pyelonephritis.**Conclusion.** The high level of cytokines and CD54+-lymphocytes in blood of patients confirm their important role in immunogenesis of pyelonephritis, the interrelation is especially interesting between CD54+-cells and TGF-β in chronic process.

ВСТУП. По частоті пієлонефрит займає друге місце серед інфекційних захворювань людини, поступаючись лише запальним захворюванням органів дихання. Тяжкість гострого пієлонефриту (ГПН) посилюється його ускладненнями, такими як: уросепсис, бактеріємічний шок, гостра ниркова недостатність, токсичний гепатит. У ряді випадків ГПН переходить у хронічну форму, яка характеризується довгим перебігом з частими рецидивами та неефективним лікуванням. Такі хворі часто звертаються до лікувальних закладів зі зниженням працездатності.

Втрата працездатності, порушення функції нирок, необхідність у нирковій замісній терапії характеризує соціально-економічний та медичний аспекти необхідності вдосконалення методів лікування гострого та хронічного пієлонефриту (ХПН). Але це можливо лише з урахуванням подальшого визначення механізмів імуногенезу цієї патології.

В останні роки в імунології розвивається напрямок вивчення ролі цитокинів, що грають роль медіаторів кооперації, а також рецепторів міжклітинної взаємодії, серед яких нас зацікавили молекули міжклітинної адгезії ICAM (intercellular adhesion molecule), привертають увагу дослідження щодо їх ролі в нормі та при розвитку патології.

Гайсенюк Федір Зиновійович
urolog2004@mail.ru

Проблема прямого переносу інформації в процесі безпосереднього контакту між клітинами вирішується за допомогою специфічних рецепторів, які представлені майже на всіх клітинах організму і забезпечують взаємодію клітин між собою і з компонентами екстраклітинного матриксу. Ці молекули відносяться до групи рецепторів контактної взаємодії (cell contact adhesion molecules) або молекул адгезії [3, 10].

За функціональними якостями всі відомі рецептори адгезії відносяться до груп: 1) молекули міжклітинної взаємодії; 2) молекули, що забезпечують взаємодію з компонентами екстраклітинного матриксу і факторів сироватки. Але на даний час основою для класифікації молекул контактної взаємодії є їх структурна схожість з сімействами білкових молекул. За структурними характеристиками виділено 7 сімейств рецепторів адгезії: 1) суперсімейство імуноглобулінів (Ig); 2) сімейство інтегринів (In); 3) сімейство селектинів (Sl); 4) сімейство муцинів (Mc); 5) сімейство кадхеринів (Cd); 6) сімейство молекул, аналогічних рецепторам фактора некроза пухлин і фактора росту нервів (TNF/NGF-R); 7) сімейство мембраноасоційованих екстроферментів і компонентів екстраклітинного матриксу (Lf-link family).

Нашу увагу привертають представники другої групи – суперсімейство імуноглобулінів, основною характеристикою яких є наявність в екстраклітинній частині молекул Ig-доменів розміром від 70 до 110 амінокислот. Ряд цих рецепторів характеризуються стабільною експресією (антигени головного комплексу гістосумісності класа I, LFA 2 і 3, CD 59, ICAM 2 і 3, PECAM-1, Thy-1), зміни якої відбуваються тільки при змінах стадії диференцировки клітин або у разі пухлинної трансформації. Навпаки, експресія інших рецепторів адгезії (CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, антигени головного комплексу гістосумісності класа II, ICAM-1 та інших) прямо залежить від активуючого впливу на клітину. В якості індукторів експресії цих рецепторів можуть виступати мітогени, прозапальні цитокини, внутрішньоклітинний сигнал з інших рецепторів контактної взаємодії [3, 10].

Зменшення концентрації імуноглобулінових рецепторів на мембранах клітин відбувається шляхом їх інтерналізації або злушчування. Перший шлях підтверджується тісним взаємозв'язком цитоплазматичної частини деяких рецепторів з компонентами цитоскелету клітин та їх здатності до кепінгу. Зворотня регуляція рецепторів за рахунок злушчування підтверджується знаходженням у ряда рецепторів (CD4, CD8, CD19, LFA-2, ICAM-1, VCAM-1, Thy-1 та ін.) розчинних форм, максимальна концентрація яких виявляється в сироватці при патологічних станах, що супроводжуються тривалою активацією клітин [16].

Найбільш цікавими для нас є ICAM, які являються рецепторами інтегринів з суперсімейства імуноглобулінів та сприяють причепленню клітин

для виконання ними їх функцій в процесі розвитку запалення. Експресія цих молекул індукується під час активації клітин; їх присутність має значення для спрямування міграції імунокомпетентних клітин в необхідний регіон та подолання бар'єрів між кров'ю та тканинами. Встановлено ряд таких молекул – ICAM-1 (CD54), -2 (CD 101), -3 (CD 50) та VCAM (CD 106). Особливий інтерес представляє вивчення ролі ICAM-1, що експресуються на поверхні клітин імунної системи та ендотелію та представлені на лімфоцитах як маркер CD54, або можуть бути присутні в невеликій кількості в розчиненому вигляді в плазмі крові.

Дослідження ряда авторів продемонстрували високу експресію ICAM-1 (CD54) при вивченні периферичної крові у хворих з септичним шоком, при алергічних захворюваннях, ендометріозі, гемолітичному синдромі [12, 17]. Показано, що підвищення рівня молекул адгезії як на лейкоцитах, так і у розчинній формі у сироватці або плазмі крові є фактором ризику розвитку нефро- та ретінопатій у хворих на цукровий діабет [4]. Високий рівень цих молекул виявлений при ревматоїдному артриті [7].

Показано важливе значення визначення рівня ICAM-1 для прогнозування активності розсіяного склерозу [5]. Виявлено роль молекул клітинної адгезії в регуляції міжклітинних взаємодій при атеросклерозі – показано, що атеросклеротичне ураження судинної стінки характеризується високим рівнем розчинних молекул адгезії та високою кореляцією із рівнем цитокинів ІЛ-1 та ІЛ-6 у сироватці. Дослідженнями показано, що рівень розчинних молекул ICAM значно вищий у хворих на ішемічну хворобу серця, особливо при нестабільній стенокардії [13].

Деякими авторами описаний вплив лікарських препаратів на молекули адгезії. Так, в роботі Tsutamoto T. et al. [15] використання кандесартана у хворих з хронічною серцевою недостатністю призводило до зниження рівня молекул адгезії ICAM-1 та VCAM-1. Інші автори продемонстрували можливість підвищення експресії цих молекул – тималін у хворих на хронічний тонзиліт підвищував знижений рівень CD54+ клітин від 7 до 13% (на відміну від інших досліджених препаратів) [6]. Отримані дані свідчать про те, що експресія молекул адгезії у хворих з хронічними захворюваннями може мати свої особливості та проявляти різну чутливість до препаратів.

Відомий вагомий внесок цитокинів в представництво молекул адгезії на поверхні клітин, але дані дослідників не завжди однозначні. Так, їх експресію можуть підвищувати ІЛ-1, ФНП- α , гама-ІФН, інгібувати – ІЛ-4, але він же разом з ІФН посилює вплив ФНП- α в тому числі на експресію ICAM-1 [2, 8, 9, 11]. Інші автори в експерименті підтверджують стимуляцію адгезивної активності через прозапальні ІЛ-1, ІЛ-2, інгібіцію – через ІЛ-4, ІЛ-10 та гама-ІФН, а ІЛ-8 та ФНП- α , за їх даними, не впливають на адгезію лімфоцитів [1, 14].

Таким чином, одним з сучасних напрямків досліджень імуногенезу ПН є вивчення механізмів порушень міжклітинної кооперації імунної системи - рецепторів міжклітинної адгезії та продукції цитокінів, які можуть впливати на їх експресію.

Метою роботи було визначення особливостей факторів міжклітинної кооперації - експресії ICAM-1 на лімфоцитах та продукції цитокінів у хворих на гострий та хронічний пієлонефрит для уявлення про механізми захворювання та можливості використання цих показників як прогностичних маркерів перебігу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ. Обстежено 25 хворих на гострий та 38 – хронічний пієлонефрит в порівнянні з 25 здоровими донорами. Постановка діагнозу «гострий/хронічний пієлонефрит» базувалась на традиційних критеріях та передбачала у кожному випадку збір загального та спеціального анамнезу, дослідження клінічної симптоматики, застосування лабораторних, ендоскопічних, рентгенрадіонуклідних, ультразвукових, мікробіологічних методів дослідження.

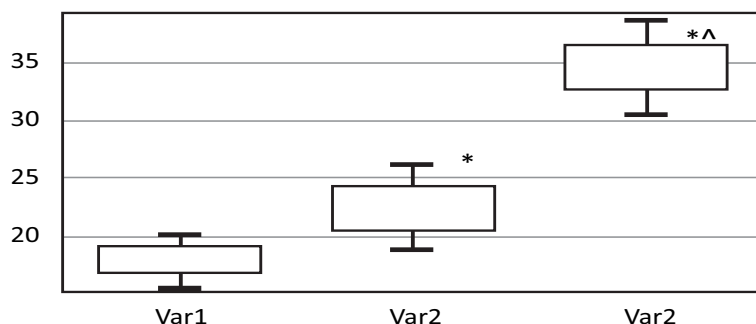
Визначення експресії ICAM-1 на клітинах виконували з використанням флуоресціюючих моноклональних антитіл (CD54) („Медбіоспектр”, Росія) та люмінесцентної мікроскопії. За допомогою ІФА на аналізаторі Stat Fax 303 Plus визначали рівень в сироватці крові про- (ІЛ-1, ФНП- α) та протизапальних (ІЛ-4, ТФР- β) цитокінів, тест-системи «Вектор Бест» (РФ), «Diaclone» (Франція) і DRG (Німеччина).

Отримані дані оброблені статистично на персональному комп'ютері за допомогою пакета програм “SPSS for Windows. Версія 11” та “MedStat”. Математична обробка одержаних результатів проводилася з урахуванням перевірки показників на нормальний розподіл з використанням критеріїв Колмогорова-Смірнова та χ^2 -квдрат. Для статистичної обробки використовувались параметричні критерії статистики - тест Ст'юдента або непараметричний – критерій Уїлкоксона. Достовірною вважали різницю при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Дослідження експресії рецепторів адгезії виявило достовірне підвищення клітин, що несуть на мембрані відповідні антигени (CD54+ лімфоцити) у хворих як на гострий ($p = 0,036$), так і хронічний пієлонефрит ($p < 0,001$), в порівнянні з нормою у здорових (рис. 1). Рівень ICAM-1+ лімфоцитів периферичної крові при ХП достовірно перевищував такий при гострому процесі в нирках – відповідно, $34,6 \pm 1,9$ в порівнянні з $22,4 \pm 1,7\%$ ($p < 0,001$).

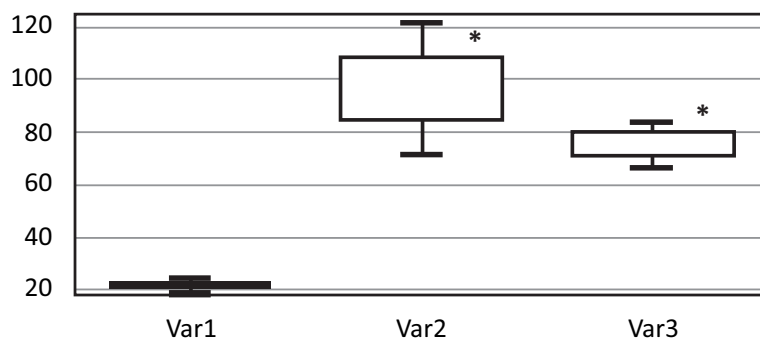
Аналіз рівнів цитокінів продемонстрував достовірне підвищення рівнів прозапальних (ФНП- α , ІЛ-1) цитокінів в сироватці крові хворих на пієлонефрит (рис. 2-3). Так, відмічено підвищення ФНП- α та ІЛ-1 як у разі ГПН ($p < 0,001$ та $p = 0,016$), так і ХПН ($p < 0,001$ для обох монокінів), але різниці між цими групами не виявлено - відповідно, $p = 0,117$ та $p = 0,119$.



* - різниця з нормою достовірна

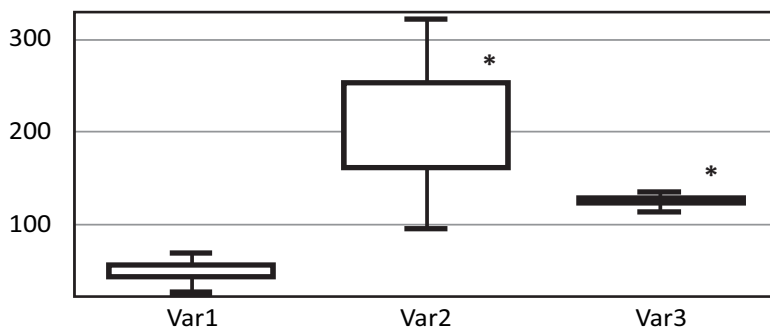
^ - різниця між групами 1 (var 2) і 2 (var 3) достовірна

Рис. 1. Відносний рівень CD54+-лімфоцитів у хворих на гострий (2) і хронічний (3) пієлонефрит у порівнянні зі здоровими донорами (1).



* - різниця з нормою достовірна

Рис. 2. Рівень ФНП- α у хворих на гострий (2) і хронічний (3) пієлонефрит у порівнянні зі здоровими донорами (1).

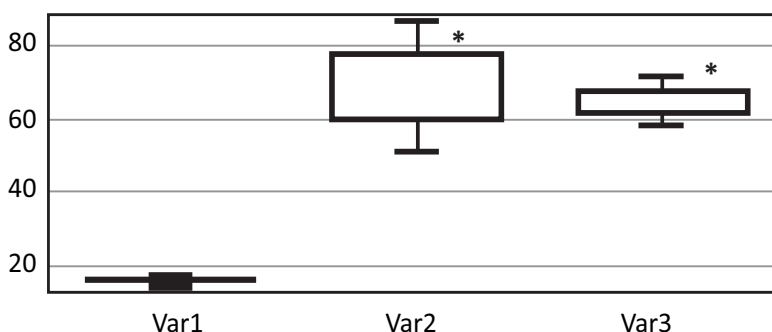


* - різниця з нормою достовірна

Рис. 3. Рівень ІЛ-1 у хворих на гострий (2) і хронічний (3) пієлонефрит в порівнянні з здоровими донорами (1).

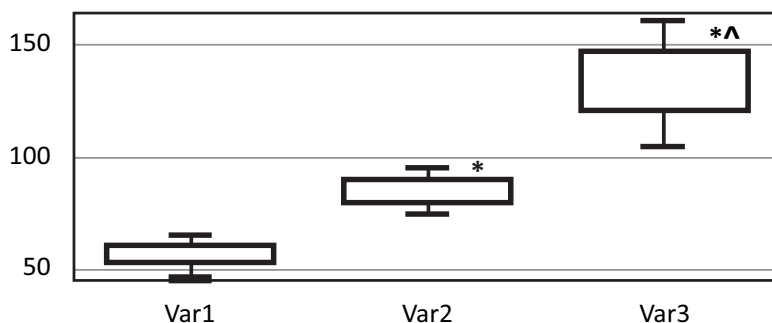
Рівень протизапальних лімфокінів був також підвищеним при пієлонефриті (рис. 4-5). Але якщо високий рівень ІЛ-4 ($p < 0,001$ при обох формах ПН) не відрізнявся при порівнянні груп між со-

бою ($p = 0,635$), то ТФР- β ($p < 0,001$ при обох формах ПН) був більш високим у пацієнтів з тривалим перебігом пієлонефриту – відповідно, $133,2 \pm 13,1$ в порівнянні з $85,0 \pm 5,0$ пг/мл ($p = 0,002$).



* - різниця з нормою достовірна

Рис. 4. Рівень ІЛ-4 у хворих на гострий (2) і хронічний (3) пієлонефрит у порівнянні зі здоровими донорами (1).



* - різниця з нормою достовірна

^ - різниця між групами 1 (var 2) і 2 (var 3) достовірна

Рис. 5. Рівень ТФР- β у хворих на гострий (2) і хронічний (3) пієлонефрит у порівнянні зі здоровими донорами (1).

ВИСНОВКИ. Таким чином, у хворих на гострий та хронічний пієлонефрит спостерігається високий рівень експресії молекул адгезії ICAM-1 на імункомпетентних клітинах за даними відносного рівня CD54+-лімфоцитів, що корелювало з підвищенням рівнів в крові прозапальних ІЛ-1, ФНП- α та протизапальних ІЛ-4, ТФР- β при обох формах захворювання. Але якщо рівень клітин, що експресують адгезивні молекули, був достовірно вище у хворих на ХПН, ніж за ГПН, то достовірної різниці рівнів цитокінів у групах не виявлено, за винятком ТФР- β , рівень якого у крові пацієнтів з ХПН перевищував показники хворих

на ГП. Можна вважати, що високий рівень цього протизапального, але просклеротичного лімфокіну асоціюється з високою адгезивною спроможністю клітин крові та ендотелію. Підвищення продукції ТФР- β у хворих є негативним фактором, тому що цей цитокін може як пригнічувати імунну відповідь, так і сприяти проліферації сполученої тканини та фіброзу нирок, погіршуючи прогноз ХПН на фоні виявленої високої експресії молекул міжклітинної адгезії ICAM-1; високі рівні цих обох показників у разі часто рецидивування ХПН можуть виступати предикторами погіршення функції нирок.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Александров А. В.* Анализ механизма модуляции межклеточных молекул адгезии ICAM / А. В. Александров, А. М. Джексон, А. Г. Румянцев // Иммунология. – 1997. - № 1. – С. 4-13.
2. *Васильева Г. И.* Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами / Г. И. Васильева, И. А. Иванова, С. Ю. Тюкавкина // Иммунология. – 2000. – № 5. – С. 11-17.
3. *Козлов И.Г.* Рецепторы контактного взаимодействия / И. Г. Козлов, Н. К. Горлина, А. Н. Череев // Иммунология. – 1995. - № 4. – С. 14-24.
4. *Кочемасова Т. В.* Состояние эндотелия и адгезия лейкоцитов при сахарном диабете / Т. В. Кочемасова // Сахарный диабет. – 2000. - № 3. – С. 17-21.
5. *Ларина И. В.* Клиническое и прогностическое значение различных иммунологических показателей при рассеянном склерозе / И. В. Ларина [и др.] / Мат. Х конф. «Нейроиммунология». – 2003. - Российский биомедицинский журнал. – С. 20-21.
6. *Мельников О. Ф.* Влияние иммуномодуляторов in vitro на экспрессию CD-антигенов на лимфоцитах периферической крови больных хроническим тонзиллитом / О. Ф. Мельников, В. В. Олейник, М.Б. Самбур [и др.] // Иммунология та алергологія. – 2004. - № 3. – С. 7-10.
7. *Насонов Е. Л.* Растворимые молекулы адгезии (P-селектин, ICAM-1 и ICAM-3) при ревматоидном артрите / Насонов Е. Л., Самсонов М. Ю., Тилз Г. П. [и др.] // Тер. архив. – 1999. - № 5. – С. 17-20.
8. *Серебрянникова С. Н., Семинский И. Ж.* Влияние цитокинов на клетки очага воспаления / С. Н. Серебрянникова, И. Ж. Семинский // «Проблемы и перспективы современной науки». – 2009. - Том 2, вып. 1. – С. 21-24.
9. *Старикова Э. А.* Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов // Медицинская иммунология / Э. А. Старикова [и др.] – 2003. – Том 5, № 1-2. – с. 39-48.
10. *Черный В. И.* Нарушения иммунитета при критических состояниях. Особенности диагностики / В. И. Черный, А. Н. Нестеренко // Внутренняя медицина». – 2007. - № 3. – С. 14-19.
11. *George Cr.* From Fahrenheit to cytokines : fever, inflammation and the kidney / Cr. George // J. Nephrol. – 2006. – Suppl 10. – P. 88-97.
12. *Inamura H.* Expression of adhesion molecules on cord-blood-derived, cultured human mast cells and effect of dexamethasone on intercellular adhesion molecule-1 expression on the mast cells by phorbol myristate acetate / H. Inamura [et al.] // Allergy. – 2001. – Vol. 56. – P. 672-678.
13. *Malik I. S.* Soluble adhesion molecules in ischaemic heart disease / I. S. Malik, D. O. Hascard // Europ. Heart J. – 1999. – Vol. 20, N 14. – P. 990-991.
14. *Sigal A.* The LFA-1 integrin supports rolling adhesion on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment / A. Sigal [et al.] // J. Immunology. – 2000. – Vol. 165. – P. 442-452.
15. *Tsujimoto Y., Shimizu S.* Bcl-2 Family : life-or-death switch / Y. Tsujimoto, S. Shimizu // FEBS. – 2000. – Vol. 466., N 1. – P. 6-10.
16. *Uchio E.* Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and interleukin-2 receptor in patients with vernal keratoconjunctivitis / E. Uchio, S. Ono, Z. Ikezawa // Allergy. – 1999. – Vol. 54. – P.135-141.
17. *Wu M.* Expression of ICAM-1 in patients with endometriosis / M. Wu // Fertility and Sterility. – 1998. – Vol. 70, N 6. – P. 1139-1142.

Надійшла до редакції 19.01.2015

Прийнята до друку 26.01.2015

© Топчій І.І., Семенових П.С., Гальчінська В.Ю., Єфімова Н.В., 2015

УДК:616.61:616.379-008.64-092

І.І. ТОПЧІЙ, П.С. СЕМЕНОВИХ, В.Ю. ГАЛЬЧІНСЬКА, Н.В. ЄФІМОВА
ПОРУШЕННЯ ВМІСТУ ВІСФАТИНУ В ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ ХВОРИХ
НА ДІАБЕТИЧНУ НЕФРОПАТІЮ

I.I. TOPCHII, P.S. SEMENOVYKH, V.YU. GALCHINSKAYA, N.V. YEFIMOVA
VISFATIN LEVEL DISTURBANCES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS
WITH DIABETIC NEPHROPATHY

ДУ «Національний інститут терапії ім. Л.Т.Малої НАМН України», м. Харків
 SI «National Institute of Therapy named after L. Malaya of NAMS of Ukraine», Kharkov

Топчій Іван Іванович
itopchiy@yandex.ua

Ключові слова: діабетична нефропатія, вісфатин, індекс маси тіла.

Key words: diabetic nephropathy, visfatin, body mass index.