

© 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 цитокіни, 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 ретинопатій 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 цитокінів 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 цитокінів 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.

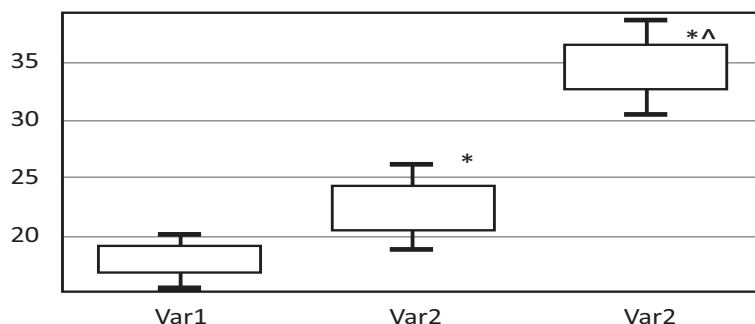
Визначення експресії ICAM-1 на клітинах виконували з використанням флуоресціюючих моноклональних антитіл (CD54) („Медбіоспектр”, Росія) та люмінесцентної мікроскопії. За допомогою ІФА на аналізаторі Stat Fax 303 Plus визначали рівень в сироватці крові про- (ІЛ-1, ФНП-α) та протизапальних (ІЛ-4, ТФР-β) 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 хі-квадрат. 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.

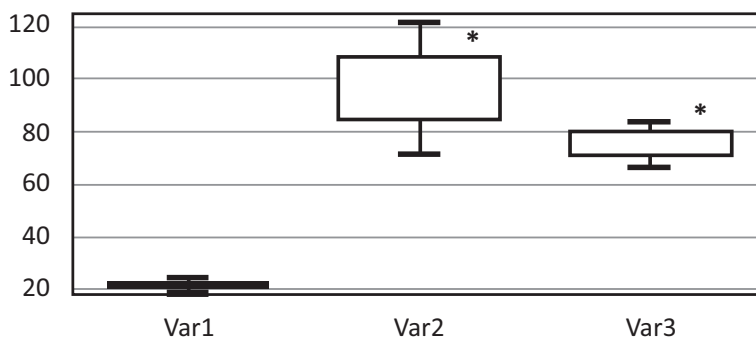
Дослідження експресії рецепторів адгезії виявило достовірне підвищення клітин, що несуть на мембрані відповідні антигени (CD54+ лімфоцити) у хворих як на гострий ($p=0,036$), так і хронічний пієлонефрит ($p < 0,001$), в порівнянні з нормою у здорових (рис. 1). Рівень ICAM-1+ лімфоцитів периферичної крові 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 $p=0,119$.



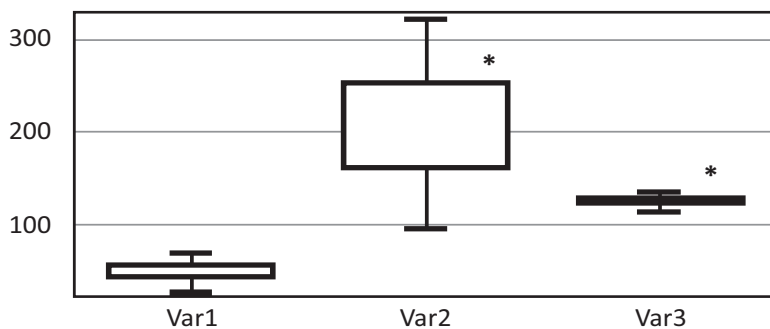
* - різниця з нормою достовірна
^ - різниця між групами 1 (var 2) і 2 (var 3) достовірна

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).

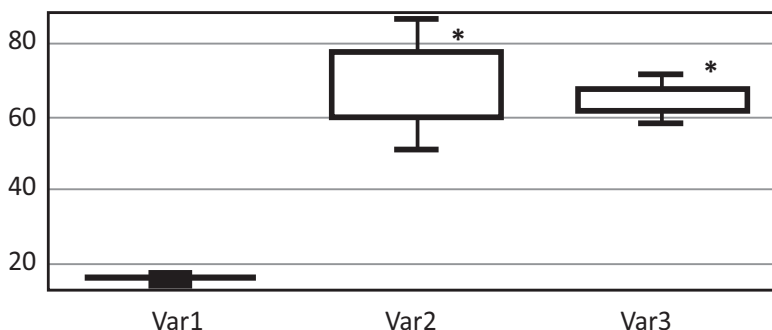


* - різниця з нормою достовірна

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

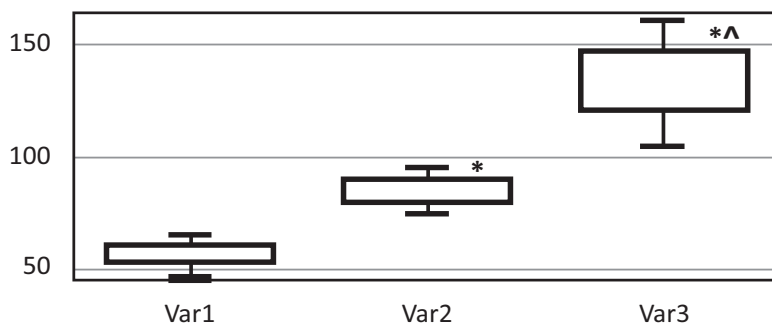
Рівень протизапальних лімфокінів був також підвищеним при пієлонефриті (рис. 4-5). Але якщо високий рівень ІЛ-4 ($p < 0,001$ при обох формах ПН) не відрізнявся при порівнянні груп між со-

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