

УДК 612.017.1:616.61-002.3:616.611-002

© Колектив авторів, 2012.

ОСОБЛИВОСТІ ІЛ-2-ЗАЛЕЖНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ У ПАЦІЄНТІВ З ЗАХВОРЮВАННЯМ НИРОК (ПІЄЛО- ТА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ)

Ф.З. Гайсенюк, В.Є. Дряньська, Є.О. Кривенко, О.П. Петрина, Г.М. Драннік¹, Т.В. Порошина¹, Н.А. Калініна¹

ДУ «Інститут нефрології АМН України»; ДУ «Інститут урології АМН України»¹, лабораторія імунології (зав. – проф. В.Є. Дряньська, проф. Г.М. Драннік¹), м. Київ.

PECULIARITIES OF THE IL-2-DEPENDENT IMMUNITY LINK IN PATIENTS WITH RENAL DISEASES (PYELO- AND GLOMERULONEPHRITIS)

F.Z. Gaysenyuk, V.E. Driyanska, E.O. Krivenko, O.P. Petrina, G.N. Drannik, T.V. Poroshina, N.A. Kalinina

SUMMARY

The peculiarities of the IL-2 production and the number of IL-2P+ cells in the PN and GN patients were analyzed. It was shown that the patients of both groups had the specific increase in the level of IL-2P+ lymphocytes but the PN patients had the increased spontaneous IL-2 production with the decrease in mytogen-induced one. The associated relations between the high levels of IL-2-dependent immunity link and HLA-phenotype (HLA-A10, DR2) in CGN and NS were found.

ОСОБЕННОСТИ ИЛ-2-ЗАВИСИМОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОЧЕК (ПИЕЛО- И ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ)

Ф.З. Гайсенюк, В.Е. Дряньская, Е.А. Кривенко, Е.П. Петрина, Г.Н. Дранник, Т.В. Порошина, Н.А. Калинина

РЕЗЮМЕ

Исследованы особенности продукции ИЛ-2 и числа ИЛ-2P+-клеток у больных ПН и ГН. Показано, что для пациентов обеих групп характерно повышение уровня ИЛ-2P+-лимфоцитов, а для больных с ПН – повышение спонтанной продукции ИЛ-2 при снижении митоген-индуцированной. Выявлены ассоциативные связи высоких показателей ИЛ-2-зависимого звена иммунитета и HLA-фенотипа (HLA-A10, DR2) при ХГН, НС.

Ключові слова: ІЛ-2, ІЛ-2P+-лімфоцити, пієлонефрит, гломерулонефрит, HLA.

У теперішній час доведена важлива роль системи інтерлейкінів у розвитку імунної відповіді. Важливого значення набуває подальше вивчення функціональної активності клітин моноцитарно-макрофагального ряду, Т-хелперів, які продукують цитокіни. Відомо, що Т-хелпери 1 типу (Т-х 1) секретують ІЛ-2, g-ІФ і ФНП та сприяють розвиткові клітинної імунної відповіді, Т-хелпери 2 типу (Т-х 2) продукують ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6 та впливають на гуморальну імунну відповідь, а Т-хелпери 3 типу (Т-х 3) являються імунорегуляторними клітинами і продукують такі важливі цитокіни як ІЛ-10 та ТФР [1, 3].

Активовані макрофаги не тільки представляють Т-лімфоцитам антигени, але й виділяють ІЛ-1, який у активованих Т-клітин збуджує синтез та секрецію ІЛ-2, а також експресію рецепторів для цього лімфокіну. ІЛ-2 є дуже важливим лімфокіном для функціонування Т-хелперів і імунної відповіді, який разом зі специфічним антигеном призводить до активації та клональної експансії Т-лімфоцитів, стимулює цитотоксичні клітини, созрівання Т-регуляторних та ін. [4, 5].

Лікування може бути спрямоване не тільки на порушення взаємодії антигенів з антитілами та сенсibiliзованими імунокомпетентними клітинами, гальмування продукції антитіл та зниження продукції

Т-хелперів (це використовується в клініці), а й впливати на різні субпопуляції хелперів – Th1 або Th2, стимулюючи, або гальмуючи вироблення ними різного спектра цитокінів. Так, ряд імуносупресантів, н-д, кортикостероїди, циклоспорин, такролімус, здатні інгібувати продукцію ІЛ-2 антиген-активованими Т-клітинами, інші (сіролімус) блокують ІЛ-2P-взаємодію [6].

У зв'язку з цим, нами була поставлена задача вивчення показників ІЛ-2-залежної ланки імунітету у хворих на хвороби нирок - пієло- (ПН) та гломерулонефрит (ГН) - для виявлення їх ролі в імунопатогенезі та можливостей корекції.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Продукцію ІЛ-2 визначали у 79 хворих на ПН (64 – гострий і 15 хронічний) та 41 – хронічний ГН, контрольна група - 15 здорових донорів.

Експресію рецепторів до ІЛ-2 визначали за допомогою методу флуоресцентного аналізу, використовуючи моноклональні антитіла anti-IL-2R ("Becton Dickinson"). В 96-лункові планшети розкапували по 5 мкл вищеназваних антитіл, додавали по 30 мкл крові, ретельно перемішували за допомогою трусу 3 секунди та інкубували в темноті при кімнатній температурі 30 хвилин. Потім додавали

200 мкл лізуючого розчину та на протязі 8 хвилин тримали на холоді при 4 С. Після центрифугування надосадок вилучали, додавали 200 мкл буферного розчину з азідом натрію, перемішували та тричі відмивали буфером за допомогою центрифугування. Фіксували осадок параформальдегідом (2% параформ розбавляли 1:1 буфером та додавали 200 мкл в кожну лунку). Планшети зберігали в холодильнику при 4 С до тестування за допомогою цитофлуориметру фірми "Becton Dickinson".

Визначалась характеристика антигенів гістосумісності та аналізувалась частота зустрічаємості різних HLA-A, -B, -DR-антигенів у 90 хворих на гострий пієлонефрит в порівнянні із 120 здоровими.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз показників хворих на гострий ПН залежно від характеру запального процесу показав, що

спонтанна продукція ІЛ-2 у хворих з серозним запаленням у нирках достовірно вище, ніж у донорів - відповідно 41,8±4,1 та 12,9±1,1 пг/мл ($p<0,001$). Це свідчить про активацію імунної системи, зокрема, Т-хелперів 1 - головних продуцентів ІЛ-2. При дослідженні мітогеніндукованої секреції ІЛ-2 було встановлено, що у здорових донорів після стимуляції клітин за допомогою ФГА цей показник зростає у 6 разів, тоді як у хворих з гострим серозним пієлонефритом достовірних змін не виявлено (рис. 1).

Аналогічні дослідження в групі хворих на гнійний ПН також виявили достовірне підвищення спонтанної продукції ІЛ-2, але з тенденцією до зниження порівняно з серозним; мітогеніндукований рівень був достовірно нижче, ніж у здорових донорів (рис. 1); в порівнянні з спонтанною секрецією, не відбувалося посилення виробки цього лімфокину при антигенній стимуляції, а у 60% пацієнтів спостерігалось зниження.

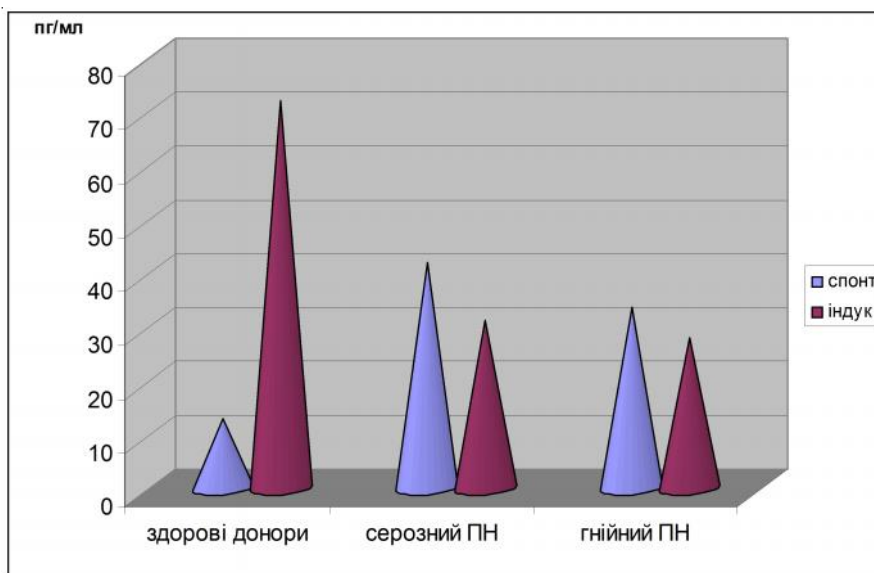


Рис. 1. Спонтанна (1) та мітогеніндукована (2) продукція ІЛ-2 у хворих на ГП та здорових донорів.

Таким чином, у пацієнтів з гострим ПН відбувається підвищення спонтанної продукції в порівнянні з нормою у здорових донорів, характерне як для серозного, так і гнійного пієлонефриту. Стимуляція клітин хворих за допомогою мітогену не призводила до підвищення продукції ІЛ-2, тоді як у здорових виявлено підвищення цього показника майже в 6 разів. У деяких хворих на гнійний ПН мало місце зниження стимульованої секреції лімфокину в порівнянні з спонтанною, що свідчить про зниження резервних можливостей лімфоцитів в умовах гострого запалення.

Результати досліджень експресії рецепторів до лімфокину показали значне підвищення числа клітин, що несуть ІЛ-2R, у хворих на ГП - 32,6±2,5% в порівнянні з нормою 8,6±1,1% ($p<0,001$).

Індивідуальний аналіз показав, що рівень ІЛ-2R⁺-клітин в крові був вище 10% у 80% хворих на ПН та 33% здорових ($p<0,05$). Якщо половина показників здорових осіб знаходилась в інтервалі 5-10% і у жодного з них не було $\geq 20\%$ ІЛ-2R⁺-клітин, то в групі хворих у 60% спостерігались такі високі цифри ($p<0,05$) (рис. 2), а у деяких хворих на ПН число лімфоцитів з рецепторами до ІЛ-2 складало 45, 52 та 68%.

Аналогічні дослідження в групі хворих з хронічним ПН (15 пацієнтів) показали, що число ІЛ-2R⁺-клітин достовірно нижче, ніж при гострому процесі, та знаходиться на рівні здорових осіб: відповідно, 6,7±1,1 та 8,6±1,1% ($p\geq 0,05$).

Якщо у хворих на ПН майже всі хворі мали високі показники ІЛ-2-залежної ланки імунітету, то при ГН

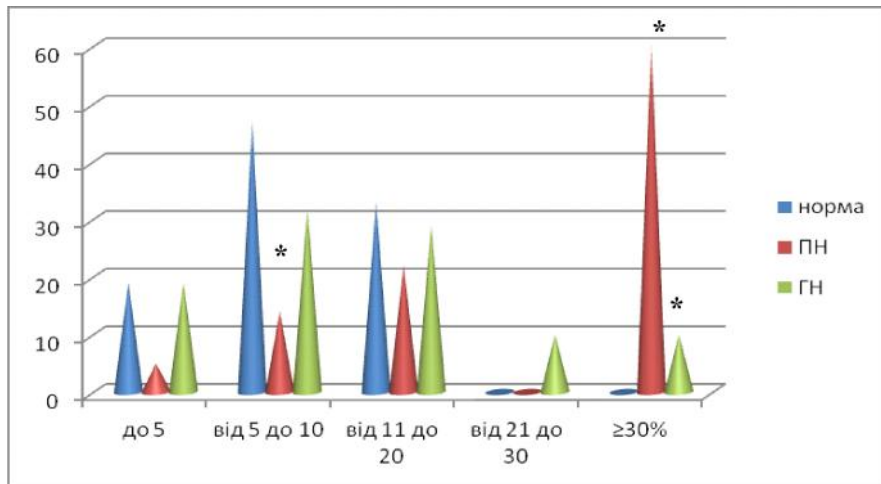
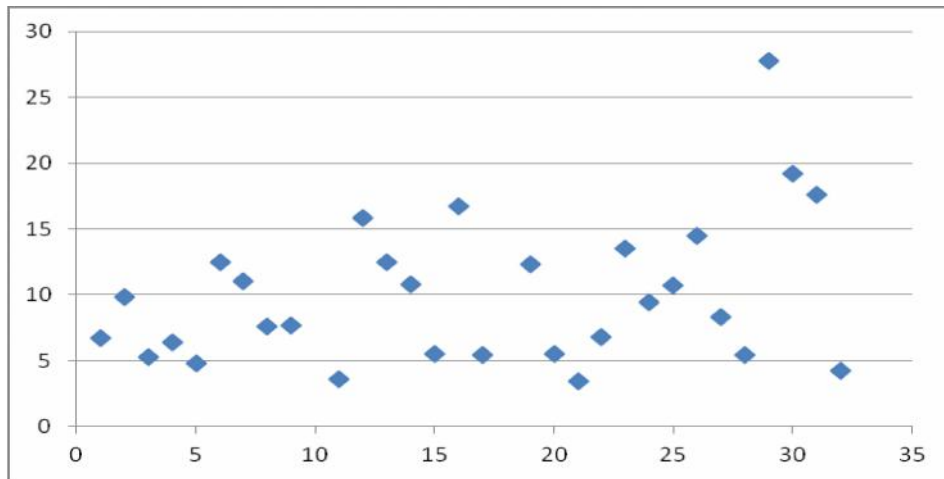
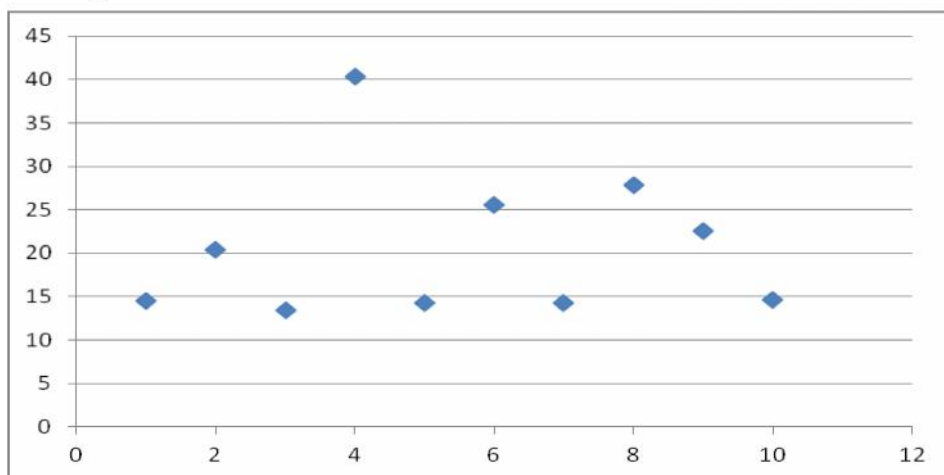


Рис. 2. Відносна кількість хворих на ПН, ГН та здорових донорів в залежності від рівню ІЛ-2Р+ - клітин в периферичній крові. * - різниця з нормою статистично достовірна.



1 група



2 група

Рис. 3. Індивідуальний аналіз продукції ІЛ-2 клітинами хворих на ХГН, НС в групах з високою (1 гр) і більш низькою (2 гр) продукцією.

середня продукція ІЛ-2 не відрізнялась від норми – $12,7 \pm 1,2$ пг/мл ($p > 0,05$), тоді як число ІЛ-2Р+–клітин достовірно підвищено – $14,9 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$), але розподіл по інтервалах рівномірний (рис. 2); існує кореляційний зв'язок між продукцією та експресією рецепторів до ІЛ-2 ($R=0,789$, $p < 0,001$). Аналіз показав, що при ХГН, НС у 10 із 41 обстеженого (1 гр.) відмічався найбільш високий рівень як продукції, так і рівня рецепторів до цього лімфокіну. В цій групі середня продукція ІЛ-2 складає $20,8 \pm 2,7$ в порівнянні

з іншими пацієнтами (2 гр) – $10,0 \pm 1,0$ ($p < 0,001$) та нормою – $12,9 \pm 1,1$ пг/мл ($p < 0,05$), а число клітин з експресією ІЛ-2Р – $30,5 \pm 5,3$ в порівнянні з $7,6 \pm 0,8$ в 2 гр. ($p = 0,002$) та $8,6 \pm 1,0\%$ в нормі ($p < 0,001$). Тобто в 2 гр. показники не відрізнялися від таких у здорових ($p > 0,05$), а в 1 гр. були достовірно вище норми і хворих іншої групи за даними як продукції цитокіну, так і кількості клітин, що експресують рецептори до нього. Індивідуальний аналіз наданий на рис. 3 і 4.

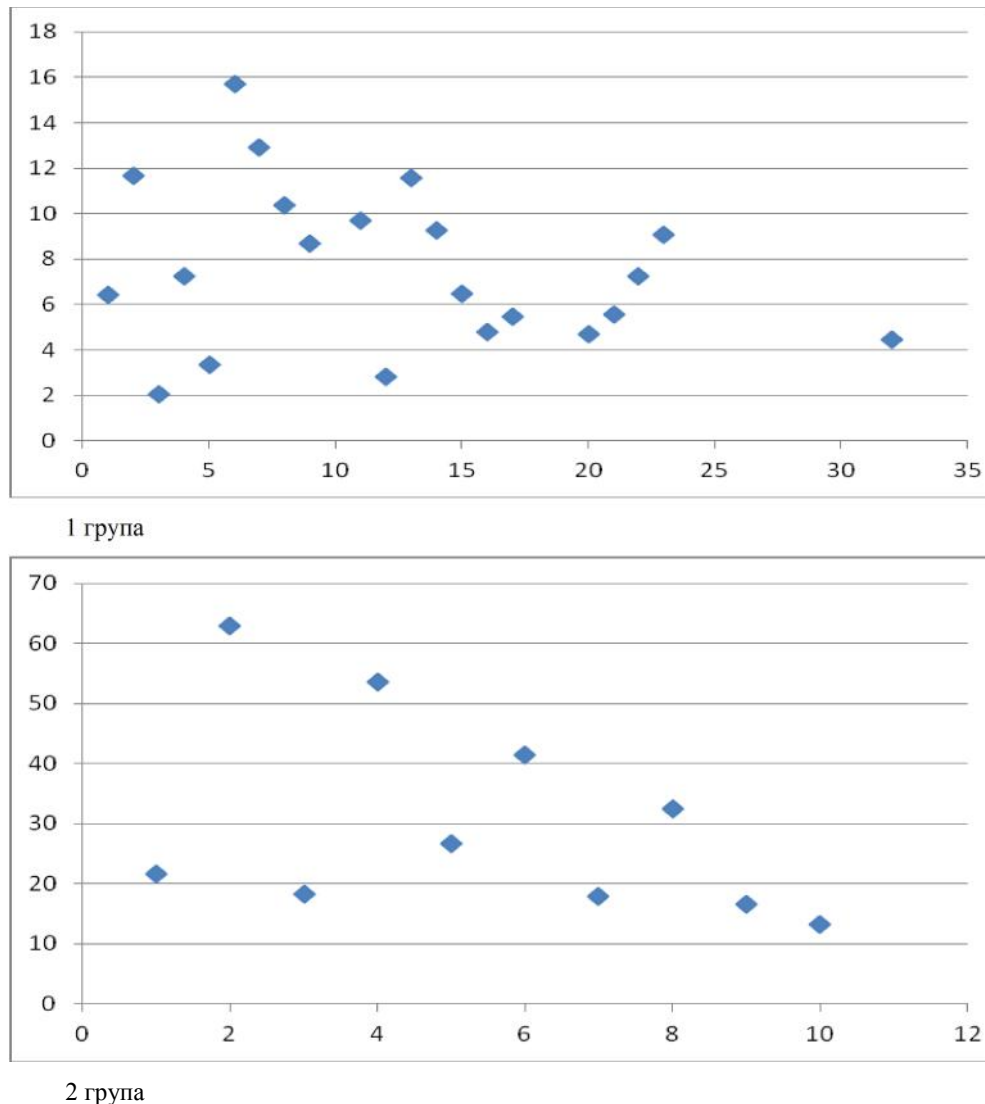


Рис. 4. Індивідуальний аналіз відносного числа ІЛ-2Р+–клітин у хворих на ХГН, НС в групах 1 і 2.

Співставлення показників у хворих показало більш високі рівні як продукції, так і експресії рецепторів до ІЛ-2 у хворих на гострий ПН порівняно як з хронічним ПН, так і ХГН, НС ($p < 0,05$).

Аналіз асоціативних зв'язків ІЛ-2-залежної ланки та особливостей фенотипу у хворих на ГН показав,

що у всіх пацієнтів 1 гр. (100%) виявлено наявність в фенотипі DR2 і у 60% - A10, тоді як в 2 гр. ці антигени виявлені, відповідно, у 38% та 42% ($p < 0,05$). Таким чином, можна заключити, що висока активність Т-хелперів 1 по продукції ІЛ-2 та вираженість на мембрані клітин, що сприймають цей лімфокін,

відповідних рецепторів асоціює з наявністю в фенотипі антигенів A10 та DR2.

Звертає увагу, що 1 група з високою продукцією ІЛ-2 та експресією рецепторів до нього складала менш ніж третину обстежених хворих, у решти хворих показники не відрізнялись від норми. Але у пацієнтів з пієлонефритом, навпаки, майже всі хворі характеризувались високими показниками ІЛ-2-залежної ланки імунітету, тому асоціації цих показників з HLA-фенотипом не виявлені, але антиген A10 є антигеном-провокатором захворювання – зустрічається у 25% хворих в порівнянні з 13,5% у здорових донорів (RR=2,1). Можна гадати, що A10, який частіше виявляється при ПН і асоціює з високою активністю Т-хелперів 1 по продукції ІЛ-2 та вираженою експресією рецепторів до нього, буде виступати предиктором задовільної імунної відповіді на патогенний чинник ГП та попереджувати негативний перебіг та хронізацію процесу в нирках, але підтвердження цим думкам можна здобути подальшими дослідженнями.

ВИСНОВКИ

Отримані дані дозволяють констатувати високу продукцію ІЛ-2 у хворих на ПН в порівнянні як з нормою, так і показниками при ХГН. На фоні активації функціональної активності Т-хелперів відбувається зниження їх резервних можливостей у хворих на гострий серозний пієлонефрит і відсутність резервів реагування у хворих з гнійним запальним процесом у нирках.

Дослідження свідчать про підвищення рівню експресії ІЛ-2P+-клітин у хворих на гострий ПН, що може вказувати на компенсаторну реакцію імунної системи на недостатню індуковану продукцію ІЛ-2 в умовах антигенної стимуляції, а також на високий ступінь активності імунокомпетентних клітин. В будь-якому випадку, у хворих на гострий ПН має місце висока готовність лімфоцитів до відповіді на ІЛ-2, що могло б сприяти позитивній реакції імунної системи на введення екзогенного ІЛ.

Розподіл популяції на основі типування HLA, можливо, дозволить передбачати, які варіанти терапії будуть найбільш ефективні для конкретних груп хворих. В цьому аспекті цікаві дослідження, які

виявили асоціації імунодефіцитного стану з антигенами HLA-B5 та -DR5 [2]. Саме у осіб з фенотипом HLA-B5 та HLA-DR5 використання деяких імуномодуляторів *in vitro* ефективно відновлювало продукцію цитокінів та проліферативні реакції на мітогени, що дозволило авторам розцінювати наявність даних антигенів не тільки як свідчення підвищеної схильності до розвитку імунодефіциту, але й як основу для можливого призначення імуномодулюючих препаратів.

Встановлені асоціації між захворюваннями нирок (пієло- та гломерулонефрит) і антигенами HLA дозволять виявляти групи високого ризику та використовувати можливі превентивні терапевтичні заходи, а також більш активну терапію при виникненні захворювання для запобігання хронізації та втрати функції нирками.

ЛІТЕРАТУРА

1. Жданов А. В. Особенности корреляционных связей в системе цитокинов / А. В. Жданов, Г. Т. Сухих, М. П. Давыдова // Бюл. Экспер. биол. и медицины. – 2003. – № 9. – С. 309-311.
2. Певницкий Л.А., Баймуканова Г.К., Писарев В.М. и др. Экологический иммунодефицит: иммуногенетические аспекты его развития и коррекции // Вестн. Российской АМН. - 1994. - №4. - С.20-27.
3. Симбирцев А. С. Цитокины - новая система регуляции защитных реакций организма / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2002. - № 1. – С. 24-27.
4. Beadling C. B. DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes / C. B. Beadling, K. A. Smith // Med. Immunol. – 2002. - № 1 (1). – P. 1-2.
5. Thornton A. M. Cutting edge : IL-2 is critically required for the *in vitro* activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function / A. M. Thornton, E. E. Donovan, C.A. Piccirillo, E.M. Shevach // J. Immunol. – 2004. - 172 (11). – P. 6519–6523.
6. Waldmann T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design / T. A. Waldmann // Nature Rev. Immun. – 2006. - 6 (8). – P. 595–601.