

УДК 616.611-002-036.12-02:579.887.11:612.017.1

## Патогенетические цитокиновые механизмы прогрессирования хронического гломерулонефрита в условиях микоплазменной инфекции

*Ж.Д. Семидоцкая, М.А. Власенко, А.П. Браславская, Е.М. Власенко**Харьковская медицинская академия последипломного образования, Харьковский национальный медицинский университет***Ключевые слова:** хроническая болезнь почек, хронический гломерулонефрит, микоплазменное инфицирование, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10

Одной из основных проблем современной клинической нефрологии является рост распространенности хронической болезни почек (ХБП), вследствие прогрессирования которой формируется хроническая почечная недостаточность (ХПН) вплоть до терминальной степени, требующей лечения в виде методов заместительной почечной терапии (ЗПТ) [1]. В структуре ХБП хронический гломерулонефрит (ХГН) занимает лидирующее место среди первичных заболеваний почек и характеризуется преимущественным поражением лиц молодого возраста, ранней потерей трудоспособности и инвалидизацией больных [1,7]. При всех значительных достижениях современной нефрологии в плане исследования механизмов прогрессирования ХГН, до сих пор часто остается невыясненным этиологический момент развития данной патологии почек, в том числе инфекционный, и соотношение иммунных и неиммунных механизмов прогрессирования заболевания [7]. Микоплазмы, вне зависимости от вида, являются представителями группы полиэтиологических заболеваний. Специфическая терапия острого микоплазмоза как правило не сопровождается гибелью возбудителя, а способствует переходу инфекционного процесса в латентную форму и протекания в виде хронически-рецидивирующего заболевания, основой патогенеза которого является персистенция инфекта [2]. При персистенции микоплазм в инфицированном организме клиническое выражение инфекционного процесса в значительной степени зависит не от инфекционного агента как такового, а от особенностей иммунореактивности организма хозяина [2,9]. Активация персистирующей микоплазменной инфекции происходит при иммунной дисфункции и под влиянием различных стрессовых ситуаций. Специфика взаимоотношения микоплазм с клетками инфицированного организма в виде межмембранного обмена поверхностными антигенными компонентами с образованием общих антигенных комплексов и их выбросом во внутреннюю среду организма и формированием ЦИК, наличием общих антигенных детерминант клеток эукариот и микоплазм, непосредственное цитопатическое и цитотоксическое влияние *M. pneumoniae et hominis* на эпителиальные, эндотелиальные и антигенпредставляющие клетки (АПК) за счет продукции про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12,  $\gamma$ -IFN, TNF- $\alpha$ ) обуславливают развитие аутоиммунных и иммунопатологических реакций [8,9]. Работа выполнена в рамках научной программы кафедры пропедевтики внутренней медицины №2 Харьковского национального медицинского университета и является фрагментом комплексной научно-исследовательской работы: «Роль инфекционной концепции в возникновении, хронизации и течения воспалительных заболеваний почек» (№ государственной регистрации 01980002623).

## Цель работы

-изучить влияние инфицирования *M. pneumoniae et hominis* и содержание провоспалительного (ИЛ-1 $\beta$ ) и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов у больных ХБП IV ст.: гломерулонефритом с нефротическим синдромом (НС).

## Материал и методы

Проведено обследование 23 больных хроническим гломерулонефритом, 11 женщин и 12 мужчин в возрасте от 18 до 52 лет, в условиях отделения нефрологии Харьковского областного клинического центра урологии и нефрологии (ХОКЦУН). Контрольную группу составляли 10 практически здоровых лиц – доноров крови в возрасте от 20 до 45 лет: 5 мужчин и 5 женщин.

Нефротический синдром диагностировался на основании клинико-лабораторных показателей: суточной потери белка с мочой более 3,5 г/л, гипопротеинемии менее 60 г/л и отечного синдрома. Изучаемые показатели сравнивались с аналогичными данными неинфицированных больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) (ДНК-) и с показателями здоровых лиц (Контроль). Иммунологические исследования проводились на базе иммунологической лаборатории ХОКЦУН. Изучались уровни провоспалительных (ИЛ-1 $\beta$ ) и противовоспалительных (ИЛ-10) цитокинов. Диагностика микоплазменной инфекции проводилась на основании обнаружения генетического материала (ДНК) *M.pneumoniae et hominis* в биологическом субстрате (моча) методом ПЦР. В зависимости от наличия или отсутствия ДНК *M.pneumoniae et hominis* больные ХБП IV ст.: ГН с НС были разделены на 2 группы следующим образом: больные ХГН без ДНК возбудителя (ДНК-) – 16 пациентов (69%), больные ХГН с ДНК *M.pneumoniae et hominis* (ДНК+) – 7 пациентов (31 %).

Количественное определение цитокинов в сыворотке крови проводилось твердофазным ИФА методом с применением наборов реагентов ProCon IL-1 $\beta$  (С.-Петербург) и IL-10 ELISA (IBL, Hamburg). Статистическую обработку данных производили при помощи прикладных программ Statistica 6.0 для Windows с использованием параметрических методов сравнения. Оценка достоверности в сравнимых группах (p) проводилась с помощью критерия Стьюдента-Фишера (t). Расхождения считались достоверными при значении  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При исследовании лабораторных показателей у всех инфицированных больных (ДНК+) ХБП IV ст.: ГН с НС вне зависимости от вида микоплазменного агента отмечен достоверный более высокий уровень суточной протеинурии на фоне изменений показателей общего белка и липидного профиля. Показатели мочевины, креатинина и электролитов плазмы крови у инфицированных (ДНК+) и неинфицированных (ДНК-) больных ХБП IV ст.: ГН с НС, достоверно не отличались между собой. Содержание холестерина, мочевины, креатинина, суточная потеря белка статистически значимо отличались во всех группах обследуемых больных от аналогичных показателей в контрольной группе референтных значений.

Табл. 1.

**Основные биохимические константы и показатели суточной протеинурии у больных хронической болезнью почек IV ст.: гломерулонефритом с нефротическим синдромом.**

Показатель	Больные ХГН с ДНК (-) <i>M.pneumoniae et hominis</i> N = 16	Больные ХГН с ДНК (+) <i>M.pneumoniae et hominis</i> N = 7	Практически здоровые N = 10
Суточная протеинурия (г/л)	6,12 $\pm$ 2,34 P1 < 0,05	9,11 $\pm$ 1,29 P1 < 0,05, P2 < 0,05	0,03 $\pm$ 0,005
Общий белок (г/л)	57,58 $\pm$ 6,85	53,6 $\pm$ 3,04 P1 < 0,05	76,7 $\pm$ 3,3
Общий холестерин (ммоль/л)	7,05 $\pm$ 1,12 P1 < 0,05	7,64 $\pm$ 1,22 P1 < 0,05	3,8 $\pm$ 0,9
Мочевина (мм/л)	17,05 $\pm$ 1,12 P1 < 0,05	18,2 $\pm$ 2,09 P1 < 0,05	5,03 $\pm$ 1,05
Креатинин (мкМ/л)	384,9 $\pm$ 50,8 P1 < 0,05	413,2 $\pm$ 36,18 P1 < 0,05	69,5 $\pm$ 11,2
Na+ (мм/л)	154,8 $\pm$ 1,96	132,7 $\pm$ 0,96	143,8 $\pm$ 0,96
K+ (мм/л)	4,47 $\pm$ 0,64	3,8 $\pm$ 0,12	4,47 $\pm$ 0,64

1. P1 < 0,05 - достоверность разности показателей группы контроля K1 и групп больных ХБП IV ст.: гломерулонефритом. 2. P2 < 0,05 - достоверность разности показателей у групп больных ХБП IV ст.: гломерулонефритом с (ДНК+) микоплазм и больных ХБП IV ст.: гломерулонефритом без инфицирования (ДНК -).

У больных ХБП 1Vст.: ГН с НС с ДНК(+) *M.pneumoniae et hominis* в биологическом субстрате (моча) имела отчетливая тенденция к нарастанию уровня общего холестерина ( $7,64 \pm 1,22$  мм/л) по сравнению с уровнем общего холестерина ( $7,05 \pm 1,12$  мм/л) у больных ХБП IV ст.: гломерулонефритом с НС без инфицирования микоплазмами (ДНК-) при сравнимом для обеих групп уровне азотемии на фоне тенденции к снижению содержания общего белка у больных ХГН с (ДНК+) ( $57,58 \pm 6,85$  г/л и  $53,6 \pm 3,04$  г/л соответственно).

Изучение уровня продукции цитокинов, характеризующих функциональную активность определенных популяций Т-лимфоцитов, позволяет оценить более тонкие механизмы иммунных процессов. Полученные данные о содержании в сыворотке крови больных ХГН ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-10 представлены в виде табл. 2.

Таблица 2.

**Содержание ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-10 в плазме крови больных ХБП IV ст.: гломерулонефритом с нефротическим синдромом.**

Показатель	Практически здоровые N = 10	Больные ХГН с ДНК (+) <i>M.pneumoniae et hominis</i> N = 7	Больные ХГН с ДНК (-) <i>M.pneumoniae et hominis</i> N = 16	P
ИЛ-1 $\beta$	10,72 $\pm$ 3,4	90,16 $\pm$ 10,52*	43,3 $\pm$ 8,43*	P < 0,01
ИЛ-10	7,99 $\pm$ 0,73	33,9 $\pm$ 7,53*	23,51 $\pm$ 6,02*	P < 0,05
ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-10	1,34	2,66*	1,84*	P < 0,05

1. \* - достоверность разницы показателей группы здоровых и групп больных с хроническим гломерулонефритом (ГН);  
2. P — достоверность разности показателей у групп больных ГН с ДНК(+) и больных ГН с ДНК(-)

Более чем 8-кратное повышение сывороточного уровня ИЛ-1 $\beta$  у больных с ДНК *M.pneumoniae* и ДНК *M.hominis* по сравнению с референтными значениями (К1) и повышение концентрации ИЛ-1 $\beta$  у больных с ДНК *M.pneumoniae* и *M.hominis* более чем в 2 раза по сравнению с больными ГН без инфицирования (ДНК-) свидетельствует о повреждающем характере клеточного инфекта на базальную мембрану нефрона, что имеет клиническое подтверждение в виде более массивной протеинурии, сопровождающееся более выраженной гиперхолестеринемией, гипопроteinемией и отеком синдромом в виде уремического интерстициального отека легких. Гиперпродукция ИЛ-1 $\beta$ , стимулирующего активность моноцитарно-макрофагальной системы, опосредованно влияет на изменения в БМК прежде всего через ИЛ-2, вызывающего протеинурию и сокращение анионных участков БМК и ИЛ-8, повышенный уровень которого в эксперименте индуцирует альбуминурию посредством нарушения метаболизма сульфатных компонентов БМК со снижением ее анионного заряда [10]. Кроме того, ИЛ-1 $\beta$  модулирует синтез противовоспалительного ИЛ-4, содержание которого в сыворотке крови детей с НС коррелирует с уровнем протеинурии [10]. Увеличение уровня ИЛ-10, контролирующего продукцию ИЛ-12, можно рассматривать как защитную реакцию, способную оказывать регулирующее противовоспалительное действие, так как в ряде экспериментальных работ показано, что ИЛ-10 совместно с ИЛ-4 и ИЛ-13 способен подавлять спонтанную и стимулированную продукцию фактора сосудистой проницаемости мононуклеарами периферической крови больных с НС [3,10]. Однако более информативным является соотношение содержания про- и противовоспалительных цитокинов, коэффициент которого свыше 1,5 ассоциируется с развитием реакций гиперчувствительности замедленного типа [3]. ИЛ-10, являясь одним из ключевых цитокинов, определяющим направленность иммунного ответа, подавляет клеточный и стимулирует гуморальный ответ, что в условиях внутриклеточного персистирования микоплазменного инфекта способствует генерализации инфекции и развитию аутоиммунных нарушений [3,9].

Единство механизмов дезадаптивного ремоделирования таких органов как почки, миокард и сосудистая стенка, поражение которых часто взаимообусловлено и сопряжено, позволило сформулировать концепцию кардиоренального синдрома, в основе которого лежит активация эндотелийзависимого звена гемостаза [7]. Формирование эндотелиальной дисфункции в условиях микоплазменного персистирования в организме человека возможно посредством влияния инфекта на NO-синтазную активность прежде всего индуцибельной NO-синтазы (i-NOS), которая активируется бактериальными эндотоксинами и провоспалительными цитокинами I-го поколения: ИЛ-1, ИЛ-6 и TNF- $\alpha$ , продуцируемых преимущественно АПК, и которые способны оказывать долговременный и общий (системный) эффект [6]. Выявление признаков микоплазменного инфицирования в 30% образцов биоптатов атеросклеротических бляшек при электронно-микроскопическом исследовании позволило предположить связь микоплазменного персистирования и процессов атерогенеза [4]. Существование микоплазм невозможно без холестерина и его производных, аминокислот и предшественников нуклеиновых кислот и микоплазмы извлекают необходимый им субстрат, вмешиваясь в обмен клеточной мембраны эндотелиоцита, влияя таким образом на основные функции эндотелия: поддержание циркуляции и реологических свойств крови, модуляцию тромбоцитарной и лейкоцитарной адгезии, трансмиграции лейкоцитов, функционирование гладкомышечных клеток

и поддержание сосудистого тонуса [5,7]. Активация i-NOS, которая повышает содержание в тканях окись азота (NO), в условиях самостоятельной продукции *M.pneumoniae* супероксидных анионов и перекисей, приводит к образованию высокотоксичного пероксинитрита (ONOO-), усилению перекисного окисления липидов, формированию окислительного стресса и синтезу провоспалительных факторов [4]. По современным представлениям окислительный стресс лежит в основе развития почечного фиброза и прогрессирования ХБП вне зависимости от ее этиологии [6]. Таким образом, длительная по времени гиперпродукция провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и TNF- $\alpha$ ) стимулированная микоплазменным персистенцированием, оказывает негативный и дезадаптивный эффект, нарушая эндотелийзависимый механизм релаксации сосудов, активируя коагуляционный каскад и тромбогенез, избыточное развитие внеклеточного коллагенового матрикса, стимулируя процессы апоптоза клеток органа-мишени посредством связывания TNF- $\alpha$  с Fas-рецепторами, что приводит к активации факторов транскрипции, металлопротеиназ, экспрессии рецепторов ряда цитокинов, ангиотензина II, простагландинов, адренергических агонистов [3, 5]. *M.pneumoniae* и *M.hominis*, активируя выработку всех основных провоспалительных цитокинов, в том числе и IFN- $\gamma$ , могут модулировать проапоптотическую активность IFN, а также напрямую влиять на индукцию апоптоза посредством активации гена интерлейкин-1 $\beta$ -конвертируемого фермента [3]. Свою негативную биологическую роль на ремоделирование почечной ткани играет и нарушение баланса между про- и противовоспалительными цитокинами (ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-10), что было убедительно доказано на «цитокиневой» модели патогенеза хронической сердечной недостаточности (ХСН) независимо от ее этиологии [6]. Мы считаем, что параллельное однонаправленное дезадаптивное влияние *M.pneumoniae* и *M.hominis* на иммунные и эндотелийзависимые механизмы прогрессирования ХГН приводят к ускоренному развитию ремоделирования почечной ткани, клиническим эквивалентом которого является быстрое формирование терминальной ХПН, требующей применения дорогостоящих методов заместительной почечной терапии.

### Выводы

Реализация иммунного ответа при микоплазменном инфицировании сопровождается гипериндуктивным цитокиновым воспалительным ответом с повышением уровня про- и противовоспалительных цитокинов (интерлейкин-1 $\beta$  и интерлейкин-10) и дисрегуляцией соотношения ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-10 в сторону повышения продукции провоспалительных цитокинов.

Наличие ДНК *M.pneumoniae et hominis* в биологическом субстрате (моча) у больных ХБП 1Vст.: ГН с НС ассоциируется с достоверной максимальной суточной протеинурией.

Наличие ДНК *M.pneumoniae et hominis* в биологическом субстрате (моча) у больных ХБП 1Vст.: ГН с НС сопровождается отчетливой тенденцией к изменению липидного профиля в виде повышения уровня общего холестерина плазмы крови.

### Литература.

1. Бильченко А.В. Хроническая болезнь почек / А.В. Бильченко // *Ліки України*. – 2008. - №9. - С. 26-30.
2. Борхсенус С.Н. Взаимодействие микоплазм с иммунной системой животных и человека / С.Н. Борхсенус, О.А. Чернова, В.М. Чернов // *Цитология*. – 2001. - №43(3). - С.219-243.
3. Бурместер Г.Р. Наглядная иммунология / Г.Р. Бурместер, А. Пейутто; пер. С.англ. Т.П. Мосолова.- Москва: БИНОМ.Лаборатория знаний, 2007.- 321 с.
4. Микоплазменные инфекции и инфаркт миокарда / П.П. Арлевецкий, О.А. Чернова, А.А. Ганева [и др.] // *Российский кардиологический журнал*. – 2003. - №4. – С. 17-27.
5. Топчий П.П. Взаимосвязь изменений антиоксидантной системы и метаболизма оксида азота у больных хронической болезнью почек с артериальной гипертензией / П.П. Топчий Т.В. Горбач, Т.Н. Бондарь // *Серце і судини*. – 2006. - №1.-С. 89-94.
6. «Цитокиновая» модель патогенеза хронической сердечной недостаточности и возможности нового терапевтического подхода в лечении декомпенсированных больных / Ю. В. Васюк, О.П. Дударенко, Е.Н. Ющук [и др.] // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* – 2006.- №4.- С. 63-71.
7. Шилов Е.М. Нефрология / Евгений Михайлович Шилов // Москва: Гэотар-Медиа, - 2007. – 683 с. (Учебное пособие для послевузовского образования)
8. Cytokines in *Mycoplasma pneumoniae* infection. / J.Yang, W.C. Hooper, D.J. Phillips [et al] // *Cytokines & Growth Factor Rev.* – 2006. – Vol. 15 – № 2–3. – P.157–168.
9. Razin S. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. / S. Razin, D. Yogen, Y. Naot // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. - Vol. 64.- P.1094-1156.
10. Value of Pretransplantation Cytokine Profiles for Predicting Acute Rejection in Renal Transplant Recipients / A. Amirzargar, M. Lessan-Pezeshki, A. Fathi. [et. al.] // *NDT*. – 2005. – Vol.37, №7. – P. 2982 – 2984.

## Патогенетичні цитокинові механізми прогресування хронічного гломерулонефриту в умовах мікоплазмозного інфікування.

Ж.Д. Семідоцька, М.А. Власенко, А.П. Браславська, О.М. Власенко

Мікоплазми можуть бути етіологічним фактором хронічної хвороби нирок, у тому числі й хронічного гломерулонефриту. При обстеженні 23 хворих хронічним гломерулонефритом у 31 % пацієнтів в сечі була виявлена ДНК *M.pneumoniae* і *M.hominis*. Також в інфікованих мікоплазмою хворих у плазмі крові спостерігалися

зміни вмісту інтерлейкіну-1 $\beta$  і інтерлейкіну-10 та їхнього співвідношення в порівнянні із хворими гломерулонефритом без інфікування та здорових донорів, що асоціювалось з вірогідною максимальною добовою протеїнурією і тенденцією до підвищення вмісту загального холестерину.

Ключові слова: хронічна хвороба нирок, хронічний гломерулонефрит, мікоплазмове інфікування, ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-10

### Pathogenic cytokine mechanisms of progression chronic glomerulonephritis in mycoplasma infection

*J.D. Semidotska, M.A. Vlasenko, A.P. Braslavskaya H.M. Vlasenko*

Mycoplasma infection can lead to end-stage renal disease such as chronic glomerulonephritis. During inspection 23 patients with chronic glomerulonephritis by occasion of mycoplasma infection were found to have a DNA M.pneumoniae and M.hominis in about 31 % of patients. The present study also delineated the changes of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-10 production and its ratio in blood serum in uraemic patients, infected by M.pneumoniae и M.hominis, in comparison with non-infected patients and healty donors.

Key words: chronic kidney disease, chronic glomerulonephritis, mycoplasma infection interleukin-1 $\beta$ , interleukin-10