

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Карзакова Л.М.<sup>1,2</sup>, Кудряшов С.И.<sup>1</sup>, Шестипалова М.В.<sup>2</sup>, Леонтьева Е.В.<sup>3</sup>

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В МОЧЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», 428015, Чебоксары, Россия;

<sup>2</sup>БУ «Городская клиническая больница №1» Минздрава Чувашской Республики, 428028, Чебоксары, Россия;

<sup>3</sup>БУ «Республиканская клиническая больница Минздрава Чувашской Республики, 428015, Чебоксары, Россия

В работе представлены данные по изучению содержания цитокинов (IL-1 $\beta$ , RAIL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) в утренней моче методом иммуноферментного анализа у здоровых лиц (n=20) и у больных острым гломерулонефритом (n=93). Определение уровней цитокинов у больных проведено в дебюте заболевания и спустя 12 месяцев после манифестации заболевания. Полученные показатели содержания цитокинов в моче представлены в виде абсолютных значений в пг/мл и нормализованных по креатинину значений, рассчитанных по формуле: уровень цитокина (пг/мл)/креатинин мочи (мкмоль/мл). Проведено изучение изменения содержания цитокинов в моче при гломерулонефрите относительно группы здоровых лиц, а также – динамики содержания цитокинов в моче за 12-месячный период наблюдения. Результаты проведенного исследования показали, что абсолютные значения цитокинов в моче могут искажать истинную картину цитокинового профиля мочи при патологии почек. Нормализованные значения преобладающего числа про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A и TNF- $\alpha$ ) у больных гломерулонефритом оказались существенно выше соответствующих показателей здоровых лиц. Нормализованные значения цитокинов проявили как более чувствительные показатели, нежели абсолютные значения, в ходе анализа различий в цитокиновом профиле у больных гломерулонефритом в зависимости от острого и хронического течения заболевания. Данные показатели влияли на исход гломерулонефрита, оцениваемый, как правило, спустя 12 месяцев после манифестации заболевания. Так, обнаруженные в дебюте заболевания низкие уровни IL-1 $\beta$ , IL-8 и IL-17A в сочетании с высоким значением содержания RAIL-1 $\beta$  определяли хронизацию гломерулонефрита. Итак, нормализованные по креатинину значения содержания цитокинов в моче расширяют возможности использования оценки цитокинового профиля мочи для установления изменений в содержании цитокинов в моче при патологии почек и прогнозирования характера клинического течения гломерулонефрита.

Ключевые слова: гломерулонефрит; цитокины; хронизация гломерулонефрита.

**Для цитирования:** Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Шестипалова М.В., Леонтьева Е.В. Определение уровней цитокинов в моче в клинической практике. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5):287-293.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-287-293>

Карзакова Л.М.<sup>1,2</sup>, С. Кудряшов С.И.<sup>1</sup>, Шестипалова М.В.<sup>2</sup>, Е. Леонтьева Е.В.<sup>3</sup>

### DETERMINING OF CYTOKINE LEVELS IN THE URINE IN CLINICAL PRACTICE

<sup>1</sup>The Ulyanov Chuvash State University, Russia, 428015, Cheboksary;

<sup>2</sup>City Clinical Hospital №1 of Health Care Ministry of Chuvashia, Russia, 428028, Cheboksary;

<sup>3</sup>Republican Clinical Hospital of Health Care Ministry of Chuvashia, Russia, 428018, Cheboksary

The paper presents data on the study of the content of cytokines (IL-1 $\beta$ , RAIL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) in the morning urine using enzyme immunoassay in healthy individuals (n = 20) and in patients with acute glomerulonephritis (n = 93). The determination of cytokine levels in patients was carried out in the debut of the disease and 12 months after the onset of the disease. The obtained indicators of cytokine content in the urine are presented as absolute values in pg/ml and creatinine-normalized values calculated by the formula: cytokine level (pg/ml) / urine creatinine ( $\mu$ mol/ml). The study was made of changes in the content of cytokines in the urine of patients with glomerulonephritis with respect to a group of healthy individuals, as well as the dynamics of the content of cytokines in the urine during the 12-month observation period. The results of the study showed that the absolute values of cytokines in urine can distort the true picture of the cytokine profile of urine in renal pathology. Normalized values of the predominant number of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A and TNF- $\alpha$ ) in patients with glomerulonephritis were significantly higher than the corresponding indicators of healthy individuals. The normalized values of cytokines were shown to be as more sensitive indicators than absolute values in the course of analyzing differences in the cytokine profile in patients with glomerulonephritis, depending on chronic and acute course of the disease. These indicators influenced the outcome of glomerulonephritis, assessed, as a rule, 12 months after the onset of the disease. Thus, the low levels of IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-17A detected in the debut of the disease in combination with the high level of RAIL-1 $\beta$  determined the chronization of glomerulonephritis. So, the creatinine-normalized cytokine levels in the urine expand the possibilities of using the evaluation of the cytokine profile of urine to establish changes in the cytokine content in the urine in renal pathology and predict the chronization of glomerulonephritis.

Key words: glomerulonephritis; cytokines; chronicity of glomerulonephritis.

**For citation:** Karzakova L.M., Kudryashov S.I., Shestipalova M.V., Leontyeva E.V. Determining of cytokine levels in the urine in clinical practice. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (5): 287-293 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-287-293>

**For correspondence:** Karzakova L.M., Dr. Sci. Med., Head of the department of internal diseases «Chuvashskii` state university; e-mail: [luzak58@mail.ru](mailto:luzak58@mail.ru)

**Information about authors:**

Karzakova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-5899-6352>

Kudryashov S.I., <http://orcid.org/0000-0003-2277-9425>

Shestipalova M.V. <https://orcid.org/0000-0003-1369-3902>

Leontyeva E.V. <https://orcid.org/0000-0002-3914-7451>

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 22.01.2019  
Accepted 15.04.2019

**Введение.** В последние годы уделялось много внимания изучению цитокинового профиля у больных с различной патологией, в том числе – с заболеваниями почек [1–4]. При этом авторы занимались преимущественно исследованием содержания цитокинов в сыворотке крови [1–3]. Однако циркулирующие в крови цитокины могут быть блокированы собственными растворимыми рецепторами или рецепторными антагонистами [4], что ограничивает использование показателей содержания цитокинов в крови в целях оценки цитокинового статуса при различных патологических состояниях. Не вызывает сомнения, что цитокины оказывают свое действие *in situ* в месте своей продукции, следовательно изучение содержания цитокинов в моче при заболеваниях почек может быть более информативным, чем определение их сывороточных уровней. В связи с приведенным предпринято настоящее исследование, целью которого явилась оценка информативности показателей содержания про- и противовоспалительных цитокинов в моче у здоровых лиц и при патологии почек, примером которой служило широко распространенное гломерулярное заболевание – гломерулонефрит (ГН).

**Материал и методы.** В ходе исследования производили забор образцов мочи для определения в них содержания цитокинов – IL-1 $\beta$  (интерлейкин-1 $\beta$ ), RAIP-1 $\beta$  (рецепторный антагонист интерлейкина-1 $\beta$ ), IL-2 (интерлейкин-2), IL-4 (интерлейкин-4), IL-10 (интерлейкин-10), TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$  (интерферон- $\gamma$ ) у практически здоровых лиц (20 человек в возрасте от 23 до 60 лет, средний возраст 34,2 $\pm$ 2,9 года) и у больных постинфекционным гломерулонефритом (ПИГН), получавших стационарное лечение в нефрологическом отделении Республиканской клинической больницы Минздрава Чувашии в 2012 – 2017 гг. (93 человека, в возрасте от 21 до 63 лет, средний возраст 36,4 $\pm$ 2,1 года). Отобранные порции мочи центрифугировали в течение 10 мин при 1000 g, затем супернатант отделяли для исследования в пластиковые пробирки. Для изучения взаимосвязи мочевых и сывороточных уровней цитокинов, дополнительно к исследованию уровней цитокинов в моче определяли содержание цитокинов выше указанного спектра в сыворотке крови. Отобранные для исследования образцы мочи и сыворотки крови хранились при -70 $^{\circ}$ С до проведения исследования. У больных ПИГН тестирование цитокинов в моче проводили дважды – в период дебюта заболевания при поступлении на стационарное

лечение (1-2-й дни от момента госпитализации) и через 12 месяцев после выписки из стационара. Больные были распределены ретроспективно через 12 месяцев в 2 группы в зависимости от результатов общеклинического обследования. В первую группу вошли пациенты – реконвалесценты после перенесенного острого ПИГН, во вторую – больные хроническим ПИГН, у которых через год после манифестации заболевания продолжали сохраняться клинические симптомы и изменения в моче, характерные для ГН (гипертензия, отеки, снижение скорости клубочковой фильтрации – СКФ – ниже 60 мл/мин, протеинурия, гематурия, лейкоцитурия, у части цилиндрурия). На следующий этап исследования было отобрано по 30 человек из каждой группы больных. При отборе пациентов добивались рандомизации групп по гендерно-возрастному, социальному составу, морфологическим формам ПИГН.

Диагностику ПИГН проводили на основе анализа клинического статуса пациентов, анамнестических данных, результатов лабораторного исследования крови и мочи, исследования почек на ультразвуковом аппарате “SSD” фирмы “Aloka” (Япония), морфологического исследования нефробиоптатов больных методом световой и люминесцентной микроскопии. Количественное определение цитокинов осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (С-Петербург) по методикам производителя лабораторных реагентов на иммуноферментном анализаторе Immunomat «Инститют Вирион/Серион ГмбХ», Германия). Полученные в ходе исследования результаты обрабатывали с помощью статистического аппарата компьютерной программы «Statistica – v. 10.0». Предварительно проводили проверку распределения полученных значений уровней цитокинов в моче и крови на соответствие нормальному (Гауссовому) распределению с помощью теста Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса. При условии, что достигнутые уровни значимости (p) были ниже критического значения, равного 0,05, отвергали нулевую гипотезу о сходстве изучаемых признаков с нормальным распределением. Использование данного подхода позволило установить асимметричность распределения совокупности значений содержания цитокинов в моче и сыворотке крови в исследуемых группах больных и у здоровых лиц, в связи с чем полученные данные представляли в виде Me (P<sub>10</sub> – P<sub>90</sub>), где Me – медиана, P<sub>10</sub> – значение 10-го перцентиля, P<sub>90</sub> – значение 90-го перцентиля. Для оценки

различий значений показателей в группах исследования использовали непараметрический критерий Манна-Уитни ( $p_{m-w}$ ). При проведении корреляционного анализа изучаемых показателей вычисляли коэффициент корреляции рангов Спирмена ( $r_s$ ), корреляционная связь считалась достоверной при  $p_{rs} < 0,05$ .

**Результаты. Цитокины в моче у здоровых лиц.** Результаты корреляционного анализа показателей цитокринового статуса в группе здоровых выявили прямую корреляцию сывороточных и мочевых уровней у двух цитокинов – IL-2 ( $r_s = 0,47$ ,  $p_{rs} = 0,035$ ) и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,78$ ,  $p_{rs} = 0,001$ ), в то время как у остальных цитокинов отсутствовала взаимосвязь между количеством выделяемой с мочой цитокина и его содержанием в сыворотке крови. Установлено существование восьми положительных связей между уровнями циркулирующих в крови цитокинов, и лишь две из них прослеживались в уровнях цитокинов в моче – это связь между парами цитокинов IL-1 $\beta$  – RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,75$ ) и TNF $\alpha$  – IFN- $\gamma$  ( $r_s = 0,47$ ). При этом в моче обнаруживался ряд корреляционных связей, не характерных для сывороточных уровней: между мочевыми уровнями IL-1 $\beta$  и IL-4 ( $r_s = 0,84$ ), IL-1 $\beta$  и IL-10 ( $r_s = 0,66$ ), IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$  ( $r_s = 0,55$ ), IL-4 и IL-10 ( $r_s = 0,49$ ), IL-4 и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,62$ ), IL-4 и IFN- $\gamma$  ( $r_s = 0,52$ ), IL-8 и IL-10 ( $r_s = 0,78$ ), IL-8 и IL-17A ( $r_s = 0,52$ ), IL-8 и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,55$ ), IL-10 и IL-17A ( $r_s = 0,60$ ), IL-10 и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,56$ ), IFN- $\gamma$  и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,60$ ).

Сывороточный уровень креатинина коррелировал отрицательно с мочевым уровнем креатинина ( $r_s = -0,47$ ,  $p_{rs} = 0,038$ ), а также – с сывороточными уровнями двух цитокинов – IL-2 ( $r_s = -0,54$ ,  $p_{rs} = 0,014$ ) и IL-17A ( $r_s = -0,49$ ,  $p_{rs} = 0,028$ ). Содержание в моче лишь одного цитокина – IL-2 – зависело от сывороточного уровня креатинина ( $r_s = -0,52$ ,  $p_{rs} = 0,020$ ). Мочевой уровень RAIL-1 $\beta$  был связан положительно с экскрецией креатинина с мочой ( $r_s = 0,76$ ,  $p_{rs} = 0,011$ ).

С целью нивелирования влияния состояния экскреторной функции почек на содержание цитокинов в моче была проведена нормализация уровней цитокинов по мочевому уровню креатинина. В табл. 1 представлены показатели абсолютного содержания цитокинов в утренней моче и нормализованные по креатинину значения. В этой же таблице приведены медианы и перцентильные интервалы сывороточных уровней цитокинов. При сравнении абсолютных значений уровней цитокинов в моче и сыворотке крови было установлено, что медианы содержания в моче всех изучаемых цитокинов превышают сывороточные уровни.

**Цитокины в моче у больных ПИГН.** В типичном случае диагноз ПИГН выставляли пациентам, у которых имелись такие клинические проявления, как отеки различной степени выраженности (от одутловатости лица до анасарки), повышение артериального давления, олигурия, потемнение цвета мочи, которые возникали через 1–3 недели после перенесенной стрептококковой, стафилококковой, микоплазменной или вирусной инфекции (фарингит, тонзиллит, пиодермия, острая респираторная инфекция верхних дыхательных путей и др.). Диагноз ПИГН при стертости, малосимптомности клинической картины заболевания потребовал в 60% случаев морфологического исследования, которое подтвердило наличие во всех исследованных случаях диффузного эндокапиллярного пролиферативного и/или экссудативного ГН. У всех больных ПИГН сывороточный уровень С3-компонента комплемента был ниже 0,9

г/л (референсные значения – от 0,9 до 1,8 г/л) и среднее значение в группе обследования больных составило  $0,52 \pm 0,11$  г/л. Изменения лабораторной картины мочи характеризовались гематурией (от микрогематурии до визуально выявляемой макрогематурии), протеинурией различной степени выраженности вплоть до нефротических уровней (более 3,5 г/сутки), в 1/3 случаев – цилиндрурией. В 57% случаев не было определенных клинических симптомов ГН, выявлялись лишь лабораторные признаки заболевания. Морфологическое исследование нефробиоптата во всех случаях выявляло наличие пролиферативного процесса в почечных клубочках: по типу диффузного эндокапиллярного пролиферативного ГН в 92%, эндокапиллярного экссудативного в 6% и экстракапиллярного ГН с образованием полулуний в 2%.

Абсолютные значения содержания в моче 5-и цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10 и TNF- $\alpha$  – были повышены у больных в дебюте ПИГН относительно значений здоровых, в то время как абсолютные уровни IL-4, IL-17A, и IFN- $\gamma$  оказались ниже показателей здоровых (табл. 2). Нормализованные значения преобладающего числа про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A и TNF- $\alpha$ ) существенно превышали соответствующие показатели здоровых лиц. Исключение составили IL-4, RAIL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$ , мочевые уровни которых в нормализованном выражении не отличались от значений здоровых.

При ретроспективном анализе характера клинического течения ПИГН спустя 12 месяцев после дебюта заболевания были выделены 2 группы больных – с острым ПИГН и хроническим ПИГН, сравнительное изучение мочевых уровней цитокинов которых выявило ряд различий (табл. 3). Обращало внимание то, что нормализованные значения содержания цитокинов имели более выраженные различия, нежели их абсолютные значения. Так, нормализованные уровни типичных провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17A – у больных хроническим ПИГН оказались в дебюте заболевания ниже по сравнению с соответствующими показателями пациентов с острым течением заболевания, а уровень RAIL-1 $\beta$  – выше. В то же время уровни IL-8 и RAIL-1 $\beta$  в абсолютном выражении не реагировали на характер клинического течения заболевания и имели практически совпадающие значения при остром и хроническом течении ПИГН. Уровни IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  не различались в группах пациентов с острым и хроническим ПИГН.

У больных с хронизацией ПИГН спустя 12 месяцев после манифестации заболевания содержание в моче IL-1 $\beta$  в абсолютном и нормализованном значениях стало выше, в то время как уровень RAIL-1 $\beta$  (как в абсолютном, так и в нормализованном выражении) – ниже, чем у пациентов с благоприятным исходом – острым течением заболевания (табл. 4). Уровни IL-2 и IL-4 стали превышать у больных с хроническим течением заболевания аналогичные показатели при остром ПИГН. У больных хроническим ПИГН стали ниже показателей пациентов с острым ПИГН абсолютное и нормализованное значения IL-10, в то время как нормализованное значение IL-17A стало выше.

**Обсуждение.** В результате проведения корреляционного анализа у здоровых лиц выявлено существование прямых связей мочевых и сывороточных уровней RAIL-1 $\beta$  и IL-2. У остальных цитокинов отсутствовала корреляция сывороточных и мочевых уровней. Общее число

корреляционных связей между мочевыми уровнями цитокинов составило 14, что намного больше количества таковых между сывороточными уровнями, равного 8, что свидетельствует о более тесной связи мочевых уровней между собой, нежели сывороточных. Это, возможно, обусловлено тем, что экскретируемые с мочой цитокины образуются локально в почках и подчиняются общим закономерностям продукции цитокинов, одним из принципов которой является каскадность активации их продукции, когда одни цитокины индуцируют синтез других [5, 6]. Кроме того, существование множества корреляционных связей уровней экскретируемых с мочой цитокинов может отражать зависимость мочевых уровней цитокинов от состояния экскреторной функции почек. Однако корреляционный анализ не позволил обнаружить связь мочевых уровней большинства цитокинов с содержанием креатинина в моче, лишь абсолютное значение содержания в моче RAIL-1 $\beta$  было положительно связано с мочевым уровнем креатинина. Отсутствие связи других цитокинов с сывороточными и мочевыми уровнями креатинина можно объяснить отчасти их малыми абсолютными значениями, коротким временем существования и быстрой утилизацией в печени и почках.

Превышение у практически здоровых лиц и у больных ПИГН мочевых уровней цитокинов соответствующих сывороточных уровней также позволяет думать, что источником экскретируемых с мочой цитокинов являются почки. Это положение подтверждается данными других авторов о локальной продукции цитокинов в пораженном органе [7, 8].

Уровни экскретируемых с мочой ряда цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  у здоровых не превышали 2-3 пкг/мл, в то время как уровни экскреции IL-2, IFN- $\gamma$  и IL-17A в целом на порядок выше уровней первого ряда цитокинов. Максимальные значения имел уровень выделяемого с мочой противовоспалительного цитокина RAIL-1 $\beta$ . Результаты исследования Sugama K. и соавторов демонстрируют примерно такие соотношения содержания цитокинов в плазме крови и моче у спортсменов [9]. Таким образом, можно полагать, что концентрации экскретируемых с мочой цитокинов связаны с уровнями их продукции в почках.

Результаты проведенного исследования показали, что абсолютные значения цитокинов в моче могут искажать истинную картину цитокинового профиля мочи при патологии почек. Так, в группе больных ПИГН в дебюте заболевания установлено снижение относительно уровней здоровых содержания IL-4, IL-17A и IFN- $\gamma$ , что совсем не укладывается в картину активации цитокиновой сети, характерную для повреждения почек. В то же время обнаруживалось повышение нормализованных по креатинину уровней большинства про- и противовоспалительных цитокинов, что согласуется с данными других авторов о повышении уровней провоспалительных цитокинов в моче при гломерулярной патологии [4], а также – об одновременном повышении в моче содержания как про-, так и противовоспалительных цитокинов при различных формах ГН [10]. Опубликовано достаточно много работ, свидетельствующих о важной роли провоспалительных цитокинов в повреждении почечных клубочков [11-18]. Показано, что один из основных провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$  образуется гломерулярными макрофагами и мезангиальными клетками, активированными в результате взаимодей-

ствия паттерн-распознающих рецепторов (PRR) данных клеток с патоген-ассоциированными молекулярными образцами инфекционных патогенов (PAMP) или продуктами повреждения собственных тканей (DAMP). В экспериментальных условиях продуцируемый в почках IL-1 $\beta$  способствовал гломерулярному некрозу, образованию полулуний в клубочках и повреждению почечных канальцев [19]. IL-8 (хемокин CXCL-8) вызывал повышение проницаемости базальной мембраны клубочков и протеинурию у крыс за счет уменьшения синтеза протеогликанов гепарансульфата [20]. Образующийся в почках TNF- $\alpha$  инициировал повреждение подоцитов гломерул, а также активировал ренин-ангиотензиновую систему [21, 22]. IL-17A считается одним из основных провоспалительных цитокинов при ГН, продуцируется Т-лимфоцитами, является хемоаттрактантом для нейтрофилов, способствует накоплению макрофагов в клубочках и блокирует супрессирующее действие Treg-клеток на аутоиммунные процессы [23–25]. Данных о прямом повреждающем действии ИЛ-2 на почки не получено, однако опубликованы положительные результаты использования в лечении больных ГН высоких доз метилпреднизолона и циклоспорина, подавляющих, как известно, выработку ИЛ-2 [26, 27]. IFN- $\gamma$  способствовал развитию оксидативного стресса, повреждению мезангиальных клеток, накоплению внеклеточного матрикса и в конечном итоге развитию нефросклероза [18, 28, 29]. IL-4 у мышей индуцировал повреждение почек и протеинурию [30]. Двум другим цитокинам – IL-10 и RAIL-1 $\beta$  – свойственны выраженные противовоспалительные и нефропротективные свойства. В ранее проведенных экспериментах введение RAIL-1 $\beta$  лабораторным животным с разными формами ГН вызывало торможение развития воспалительного процесса в почках, снижало протеинурию, восстанавливало функции почек [31, 32]. IL-10 предотвращал образование и отложение иммунных комплексов в почечных клубочках, а также препятствовал прогрессированию ГН [33–35].

Нормализованные значения цитокинов проявили как более чувствительные показатели, нежели абсолютные значения, и в ходе анализа различий в цитокиновом профиле у больных ПИГН в зависимости от характера клинического течения – острого или хронического. Так, уже в дебюте ПИГН при хроническом течении заболевания можно было отметить определенные особенности в цитокиновом профиле мочи – низкие уровни провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-8 и IL-17A на фоне высокого уровня RAIL-1 $\beta$ . О низких уровнях IL-1 $\beta$  и IL-17A свидетельствовали как абсолютные, так и нормализованные значения содержания цитокинов в моче. Снижение уровня IL-8 и повышение уровня RAIL-1 $\beta$  обнаруживались лишь благодаря использованию нормализованных значений, так как абсолютные значения данных цитокинов не реагировали в дебюте ПИГН на характер клинического течения заболевания.

Спустя 12 месяцев наблюдения произошла инверсия характера выявленных различий в уровнях IL-1 $\beta$ , IL-17A и RAIL-1 $\beta$ : так, абсолютное и нормализованное значения исходно низкого уровня провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  стали выше при хроническом ПИГН, также стало выше нормализованное значение IL-17A, а уровень противовоспалительного цитокина RAIL-1 $\beta$  – ниже, чем у пациентов с благоприятным исходом – острым течением заболевания. Сохранение у больных ПИГН высоких уровней цитокинов с провоспалитель-

Таблица 1

Содержание цитокинов в моче и сыворотке крови у здоровых лиц (n=20)

Цитокин	Уровень в моче		Уровень в сыворотке крови
	Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )		Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )
	пг/мл	пг/мкмоль креатинина мочи	пкг/мл
IL-1β	0,02 (0,01 - 0,08)**	0,00 (0,00 - 0,01)	0,00 (0,008 - 7,00)
IL-2	10,61 (8,06 - 96,00)**	1,60 (0,65 - 6,52)	3,23 (0,58 - 17,87)
IL-4	2,39 (1,63 - 2,81)***	0,21 (0,12 - 0,53)	0,00 (0,00 - 3,95)
IL-8	0,19 (0,00 - 33,54)**	0,02 (0,00 - 3,66)	0,00 (0,00 - 4,95)
IL-10	2,99 (2,39 - 3,50)***	0,27 (0,15 - 0,57)	0,00 (0,00 - 0,50)
IL-17A	48,3 (33,6 - 71,6)***	4,55 (2,50 - 11,57)	4,08 (2,95 - 12,80)
RAIL-1β	851,8 (304,1 - 1726)**	67,5 (48,4 - 154,9)	88,97 (0,56 - 128,05)
TNF-α	1,96 (1,88 - 2,30)***	0,19 (0,11 - 0,42)	1,72 (1,62 - 1,92)
IFN-γ	13,87 (9,40 - 22,78)***	1,41 (0,75 - 2,43)	6,16 (1,30 - 10,39)

Примечание. Звездочками обозначена достоверность различия абсолютного значения уровня цитокина в моче относительно уровня в сыворотке крови: \*\* - p<sub>m-w</sub> < 0,01, \*\*\* - p<sub>m-w</sub> < 0,001.

Таблица 2

Содержание цитокинов в моче у больных ПИГН в дебюте заболевания и у здоровых лиц

Цитокины		Здоровые	Больные ПИГН	p <sub>m-w</sub> <
		n=20	n=60	
		Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )	Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )	
IL-1β	пг/мл	0,02 (0,01 - 0,08)	3,31 (0,06 - 31,99)	0,001
	норм.	0,00 (0,00 - 0,01)	0,60 (0,01 - 16,22)	0,001
IL-2	пг/мл	10,61 (8,06 - 96,00)	12,84 (11,40 - 173,70)	0,05
	норм.	1,16 (0,65 - 6,52)	3,14 (1,25 - 34,74)	0,01
IL-4	пкг/мл	2,39 (1,63 - 2,81)	1,45 (1,23 - 2,03)	0,001
	норм.	0,21 (0,12 - 0,53)	0,22 (0,11 - 3,36)	NS
IL-8	пг/мл	0,19 (0,00 - 33,54)	19,98 (0,73 - 148,50)	0,001
	норм.	0,02 (0,00 - 3,66)	3,75 (1,25 - 25,06)	0,001
IL-10	пг/мл	2,99 (2,39 - 3,50)	3,71 (2,35 - 6,78)	0,01
	норм.	0,27 (0,15 - 0,57)	0,69 (0,41 - 1,99)	0,001
IL-17A	пг/мл	48,35 (33,68 - 71,67)	36,65 (34,13 - 63,81)	0,05
	норм.	4,55 (2,50 - 11,57)	7,33 (3,14 - 36,52)	0,001
RAIL-1β	пг/мл	851,8 (304,1 - 1726)	401,2 (176,7 - 1668)	NS
	норм.	67,5 (48,4 - 154,9)	76,6 (22,3 - 289,7)	NS
TNF-α	пг/мл	1,96 (1,88 - 2,30)	2,06 (1,88 - 2,42)	0,05
	норм.	0,19 (0,11 - 0,42)	0,40 (0,18 - 1,84)	0,001
IFN-γ	пг/мл	13,87 (9,40 - 22,78)	9,53 (2,82 - 20,95)	0,01
	норм.	1,41 (0,75 - 2,43)	2,13 (0,64 - 8,25)	NS
Креатинин	мкмоль/мл	11,3 (4,6 - 19,3)	5,0 (1,0 - 11,6)	0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2-4: норм. – нормализованное по креатинину мочи значение уровня цитокина в пг/мкмоль креатинина мочи; NS – различие не достоверно (p > 0,05).

ными и нефротоксическими свойствами (IL-1β, IL-2, IL-17A и IL-4) на фоне снижения уровней противовоспалительных цитокинов – RAIL-1β и IL-10, по всей видимости, способствует хроническому течению гломерулярного повреждения.

В литературе ранее были описаны изменения содержания цитокинов в сыворотке крови у больных в дебюте и динамике ГН в зависимости от характера клинического течения заболевания [2, 36]. В частности, у детей с хроническим течением ГН было обнаружено снижение относительно показателя здоровых лиц снижение уровня RAIL-1β при неизменном значении данного показателя у пациентов с острым ГН. При этом у последних выявлялось повышение содержания в сыворотке крови уровня IL-4 при сохранении его на уровне здоровых

у пациентов с хроническим ГН. Формирование хронизации ГН ассоциировалось с повышением содержания циркулирующих в крови провоспалительных цитокинов – IL-1β, TNF-α и IL-8 при отсутствии динамики в содержании противовоспалительных цитокинов. В литературе мы не нашли данных по исследованию различий в мочевых уровнях цитокинов у больных ПИГН острого и хронического течения.

Полученные нами данные позволяют предположить, что хроническое течение ПИГН связано с исходно сниженной функциональной активностью клеток врожденного иммунитета – снижением способности продуцировать «ранний» провоспалительный цитокин – IL-1β и сопряженных с ними других провоспалительных цитокинов – IL-8 и IL-17A на фоне повышенной продук-

Таблица 3

Содержание цитокинов в моче у больных острым ПИГН и хроническим ПИГН в дебюте заболевания

Цитокины		Острый ПИГН n=30	Хронический ПИГН n=30	P <sub>м-и</sub> <
		Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	
IL-1β	пг/мл	6,99 (0,06 - 31,99)***	0,36 (0,04 - 27,85)***	0,05
	норм.	1,19 (0,01 – 20,22) ***	0,08 (0,001 – 3,76)***	0,01
IL-2	пг/мл	12,8 (11,41 – 173,7)*	13,52 (10,41 – 4572)	NS
	норм.	2,19 (1,7 – 47,74)*	3,2 (2,1 – 55,83)**	NS
IL-4	пкг/мл	1,40 (0,86 – 3,36)**	1,56 (1,28 – 1,82)***	NS
	норм.	0,26 (0,15 – 0,62)	0,35 (0,26 – 0,74)**	NS
IL-8	пг/мл	28,85 (6,75 – 148,5) ***	11,68 (0,33 – 105,50)**	NS
	норм.	6,75 (1,7 – 34,06) ***	2,55 (0,03 – 17,67)***	0,01
IL-10	пг/мл	3,89 (1,99 – 6,24)	3,63 (2,46 – 7,58)**	NS
	норм.	0,73 (0,41 – 2,69) ***	0,81 (0,23- 2,69)***	NS
IL-17A	пг/мл	46,6 (36,47 – 62,89)**	32,63 (24,72 – 48,50)	0,05
	норм.	8,85 (7,14 – 12,52)*	7,20 (5,91 – 9,51)*	0,05
RAIL-1β	пг/мл	401,2 (259,2-943,8)*	621,90 (125,0 – 6900,0)	NS
	норм.	76,59 (22,3 – 189,7)	143,93 (29,07 – 1500,0)	0,05
TNF-α	пг/мл	2,03 (1,84 – 2,38)	2,07 (1,92 – 2,42)**	NS
	норм.	0,38 (0,34 – 0,44)**	0,47 (0,33 – 0,53)**	NS
IFN-γ	пг/мл	7,44 (2,82 – 12,93)***	12,07 (4,89 – 44,52)	NS
	норм.	1,40 (0,64 – 2,82)	2,2 (0,64 – 5,3)	NS
Креатинин	мкмоль/мл	5,4 (1,0– 9,6)	4,5 (1,0 – 10,3)	NS

Примечание. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 – различие относительно значения показателя здоровых лиц; P<sub>м-и</sub> – различие между показателями групп больных.

Таблица 4

Содержание цитокинов в моче у больных острым и хроническим ПИГН через 12 месяцев после манифестации заболевания

Цитокины		Острый ПИГН n=30	Хронический ПИГН n=30	P <sub>м-и</sub> <
		Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	
IL-1β	пг/мл	0,06 (0,03 - 0,11)***	23,32 (0,24 - 48,49)***	0,001
	норм.	0,005 (0,001 - 0,01)	2,41 (0,02 - 4,61)***	0,001
IL-2	пг/мл	20,55 (10,61 - 31,66)	57,3 (11,2 - 204,2)**	0,05
	норм.	1,99 (1,25 - 3,31)	6,33 (2,13 - 23,81)**	0,001
IL-4	пкг/мл	1,47 (1,16 - 3,39)	2,04 (1,43 - 4,43)	0,01
	норм.	0,13 (0,11 - 0,34)	0,21 (0,13 - 0,41)	0,01
IL-8	пг/мл	39,04 (1,04 - 55,72)***	25,25 (4,88 - 53,19)***	NS
	норм.	3,51 (0,16 - 6,20)**	2,65 (0,57 - 5,63)**	NS
IL-10	пг/мл	14,57 (3,58 - 101,0)***	2,92 (2,26 - 4,39)	0,05
	норм.	1,30 (0,43 - 8,55)***	0,31 (0,21 - 0,37)	0,001
IL-17A	пг/мл	54,98 (34,51 - 75,68)	89,19 (50,8 - 124,2)	NS
	норм.	5,18 (3,51 - 8,92)	9,34 (5,5 - 16,60)*	0,01
RAIL-1β	пг/мл	1219 (804 - 2143)**	343 (221 – 1101)*	0,001
	норм.	104 (74 – 204)	35,8 (21,12 - 120,5)*	0,05
TNF-α	пг/мл	2,25 (1,07 - 2,35)	2,17 (1,89 - 2,54)*	NS
	норм.	0,22 (0,20 - 0,24)	0,23 (0,19 - 0,27)	NS
IFN-γ	пг/мл	14,06 (8,00 - 17,79)	10,26 (8,53 - 13,76)*	NS
	норм.	1,32 (0,74 - 1,75)	1,71 (0,79 - 1,88)	NS
Креатинин	мкмоль/мл	10,2 (6,3-23,5)	9,5 (5,1- 12,8)	0,05

Примечание. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 – различие относительно значения показателя здоровых лиц; P<sub>м-и</sub> – различие между показателями групп больных.

ции RAIL-1β. В результате иммунный ответ оказывается неэффективным, патоген не удаляется, и сохраняется практически на первоначальном уровне активности клеток врожденного иммунитета, продолжающих синтезировать провоспалительные цитокины IL-1β, IL-17A,

в то время как у пациентов с благоприятным исходом снижаются до уровней здоровых лиц абсолютное и нормализованное значения IL-17A, а также нормализованное значение IL-1β. Большинство исходно повышенных нормализованных уровней других цитокинов (IL-2,

TNF- $\alpha$ ) у пациентов с острым ПИГН снижалось спустя 12 месяцев после дебюта заболевания и сравнивалось со значениями группы здоровых.

**Заключение.** Итак, использование нормализованных по креатинину значений содержания цитокинов в моче расширяет возможности использования оценки цитокинового профиля мочи для установления изменений в содержании цитокинов в моче при патологии почек, а также для прогнозирования характера клинического течения ПИГН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-35 см. REFERENCES)

2. Жизневская И.И., Хмелевская И.Г., Разинькова Н.С., Калинина З.Н. Динамика иммунологических показателей при острых и хронических гломерулонефритах у детей. *Фундаментальные исследования*. 2014; 4(2): 269-73.
36. Жизневская И.И., Хмелевская И.Г. Особенности цитокинового профиля при гломерулопатиях у детей. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. Курск, 2013; 1: 62-6.

#### REFERENCES

1. Simmons E.M., Himmelfarb J., Sezer M.T., Chertow G.M., Mehta R.L., Paganini E.P. et al. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney Int.* 2004; 65(4): 1357-65.
2. Zhiznevskaya I.I., Khmelevskaya I.G., Razinkova N.S., Kalinina Z.N. Dynamics of immunological parameters in acute and chronic glomerulonephritis in children. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 4 (2): 269-73. (in Russian)
3. Zhang Z., Wang H., Zhang L., Crew R., Zhang N., Liu X. et al. Serum Levels of Soluble ST2 and IL-10 Are Associated with Disease Severity in Patients with IgA Nephropathy. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016:6540937.
4. Al-Eisa A.A., Al Rushood M., Al-Attayah R.J. Urinary excretion of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 cytokines during relapse and remission of idiopathic nephrotic syndrome. *J. Inflamm. Res.* 2017; 10:1-5.
5. Beal A. L., Cerra F. B. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA*. 1994; 271(3): 226-33.
6. Suzuki K., Nakaji S., Yamada M., Totsuka M., Sato K., Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc. Immunol. Rev.* 2002; 8: 6-48.
7. Wada T., Furuichi K., Segawa-Takaeda C., Shimizu M., Sakai N., Takeda S.I. et al. MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999; 56(3): 995-1003.
8. Stangou M., Bantis C., Skoularopoulou M., Korelidou L., Koulokouriotou D., Scima M. et al. Th1, Th2 and Treg/T17 cytokines in two types of proliferative glomerulonephritis. *Indian J. Nephrol.* 2016; 26(3):159-66.
9. Sugama K., Suzuki K., Yoshitani K., Shiraishi K., Kometani T. Urinary excretion of cytokines versus their plasma levels after endurance exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* 2013; 19: 29-48.
10. Kalavrizioti D., Gerolymos M., Rodi M., Kalliakmani P., Provatopoulou S., Eleftheriadis T. et al. "T helper (Th)-cytokines in the urine of patients with primary glomerulonephritis treated with immunosuppressive drugs: can they predict outcome?" *Cytokine*. 2015; 76(2): 260-9.
11. Cho B.S., Yoon S.R., Jang J.Y., Pyun K.H., Lee C.E. Upregulation of interleukin-4 and CD23/Fc epsilon RII in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 1999; 13(3): 199-204.
12. Noronha I.L., Niemi Z., Stein H., Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1995; 10(6): 775-86.
13. Pereira Wde F., Brito-Melo G.E., Guimarras F.T., Carvalho T.G., Mateo E.C., Simxes e Silva A.C. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. *Inflamm. Res.* 2014; 63(1): 1-12.
14. Shao X.S., Yang X.Q., Zhao X.D., Li Q., Xie Y.Y., Wang X.G. et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in

- children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2009; 24(9): 1683-90.
15. Kanai T., Yamagata T., Momoi M.Y. Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  and interleukin-8 associated with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr. Int.* 2009; 51(4): 443-7.
16. Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2014; 10(9): 493-503.
17. Kurts C., Panzer U., Anders H.J., Rees A.J. The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(10): 738-53.
18. Bai J., Wu L., Chen X., Wang L., Li Q., Zhang Y. et al. Suppressor of Cytokine Signaling-1/STAT1 Regulates Renal Inflammation in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis Models. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1982.
19. Lichtnekert J., Kulkarni O.P., Mulay S.R., Rupanagudi K.V., Ryu M., Allam R. et al. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26778.
20. Pan Q., Wu J., Tao J., Chen Y., Li L., Deng Z. et al. Role of basophils in the pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome: a literature review. *Exp. Ther. Med.* 2014; 8(4): 1027-31.
21. Zhang J., Patel M.B., Griffiths R., Mao A., Song Y.S., Karlovich N.S. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  produced in the kidney contributes to angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*. 2014; 64(6): 1275-81.
22. Pedigo C.E., Ducasa G.M., Leclercq F., Sloan A., Mitrofanova A., Hashmi T. et al. Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(9): 3336-50.
23. Velden J., Paust H.J., Hoxha E., Turner J.E., Steinmetz O.M., Wolf G. et al. Renal IL-17 expression in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012; 302(12): 1663-73.
24. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., Victora G.D. et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function. *Nature*. 2008; 453(7192): 236-40.
25. Korn T., Reddy J., Gao W., Bettelli E., Awasthi A., Petersen T.R. et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 2007; 13(4): 423-31.
26. Shin J.I. Inverse relationship between soluble urokinase receptors and estimated glomerular filtration rate: a role for IL-2? *Kidney Int.* 2015; 87(5): 1074.
27. Shishido S., Satou H., Muramatsu M., Hamasaki Y., Ishikura K., Hataya H. et al. Combination of pulse methylprednisolone infusions with cyclosporine-based immunosuppression is safe and effective to treat recurrent focal segmental glomerulosclerosis after pediatric kidney transplantation. *Clin. Transplant.* 2013; 27(2): 143-50.
28. Hua K. F., Yang S. M., Kao T. Y., Chang J. M., Chen H. L., Tsai Y. J. et al. Osthole mitigates progressive IgA nephropathy by inhibiting reactive oxygen species generation and NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway. *PLoS One*. 2013; 8(10): e77794.
29. Gao J., Wei L., Liu X., Wang L., Niu D., Jin T. et al. Association Between IFN- $\gamma$  Gene Polymorphisms and IgA Nephropathy in a Chinese Han Population. *Kidney Blood Press. Res.* 2017; 42(1): 136-44.
30. Kim A.H., Chung J.J., Akilesh S., Koziell A., Jain S., Hodgin J.B. et al. B cell-derived IL-4 acts on podocytes to induce proteinuria and foot process effacement. *JCI Insight*. 2017; 2(21): e81836.
31. Lan H.Y., Nikolic-Paterson D.J., Zarama M., Vannice J.L., Atkins R.C. Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by the interleukin-1 receptor antagonist. *Kidney Int.* 1993; 43(2): 479-85.
32. Chen A., Sheu L.F., Chou W.Y., Tsai S.C., Chang D.M., Liang S.C. et al. Interleukin-1 receptor antagonist modulates the progression of a spontaneously occurring IgA nephropathy in mice. *Am. J. Kidney Dis.* 1997; 30(5): 693-702.
33. Yin Z., Bahtiyar G., Zhang N., Liu L., Zhu P., Robert M.E. et al. IL-10 regulates murine lupus. *J. Immunol.* 2002; 169(4): 2148-55.
34. Zhang R., Li Q., Chuang P.Y., Lu G., Liu R., Yang J. et al. Regulation of pathogenic Th17 cell differentiation by IL-10 in the development of glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 2013; 183(2): 402-12.
35. Ostmann A., Paust H.J., Panzer U., Wegscheid C., Kapffer S., Huber S. et al. Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; 24(6): 930-42.
36. Zhiznevskaya I.I., Khmelevskaya I.G. Features of cytokine profile in children with glomerulopathy. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik Chelovek i ego zdorov'e*. 2013; 1: 62-6. (in Russian)