

ПРОДУКЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

УДК 616.72-002.772-053.2

И.А. Пашнина^{1,2}, И.М. Криволапова^{1,2}, Е.С. Козлова¹, О.В. Скоробогатова¹

1 Областная детская клиническая больница № 1, г. Екатеринбург, Российская Федерация

2 Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Обследованы дети и подростки 2—17 лет с ювенильным идиопатическим артритом (n=100) и условно здоровые дети соответствующего возраста (контроль, n=31). Методом ИФА определяли концентрацию ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ИНФ-γ и ФНО-α в супернатантах спонтанных и стимулированных фитогемагглютинином культур клеток периферической крови. Выявлена более интенсивная спонтанная продукция клетками крови ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНОα и ИНФγ у больных по сравнению с контрольной группой, что отражает участие данных цитокинов в патогенезе ювенильного артрита. Снижение выработки ИЛ-1β, ИЛ-8 и ИНФγ при стимуляции митогеном у детей с ювенильным идиопатическим артритом по сравнению со здоровыми детьми свидетельствует об истощении функциональных резервов иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: цитокины, ювенильный идиопатический артрит.

THE PROINFLAMMATORE CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS

I.A. Pashnina^{1,2}, I.M. Krivolapova^{1,2}, E.S. Kozlova¹, O.V. Skorobogatova¹

1 Regional Children's Clinical Hospital № 1, Yekaterinburg, Russian Federation

2 Institute of immunology and physiology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci., Yekaterinburg, Russian Federation

Children and teenagers with juvenile idiopathic arthritis (n=100) and conditionally healthy children (n=31) were investigated. The concentration of IL-1β, IL-6, IL-8, IF-γ and TNF-α in supernatants of spontaneous and stimulated by phitogemmagglutinin peripheral blood cells cultures were defined by ELISA. It was found that the spontaneous production of IL-1β, IL-8, IF-γ and TNF-α was more intensive in patients with arthritis in comparison with control, and it was the evidence of important role of these cytokines in pathogenesis of juvenile arthritis. Low mitogen-stimulated levels of IL-1β, IL-8 and IF-γ in children with arthritis in comparison with healthy children indicates depletion of immunocompetent cells functional reserves.

Keywords: cytokines, juvenile idiopathic arthritis.

Введение

Актуальной проблемой современной педиатрии и ревматологии является диагностика и лечение воспалительных заболеваний суставов, среди которых наиболее распространенным является ювенильный идиопатический артрит (ЮИА). ЮИА является гетерогенной группой заболеваний преимущественно аутоиммунной/ аутовоспалительной природы и объединяет несколько вариантов, механизмы развития которых отличаются [1]. Наиболее распространенным методом диагностики аутоиммунных заболеваний является определение аутоантител. Для диагностики ревматоидного артрита у взрослых пациентов в настоящее время широко применяется определение ревматоидного фактора и антител к цитруллинированным пептидам [2]. Однако все перечисленные антитела редко обнаруживаются при ЮИА, другие специфические лабораторные маркеры этого заболевания не известны [1].

Одним из важных компонентов патогенеза ЮИА является дисбаланс между продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов с преобладанием синтеза первых над вторыми [1]. Однако данные об уровне ЦК в сыворотке крови и других биологических жидкостях при ЮИА весьма противоречивы. Сообщается об увеличении концентрации провоспалительных ЦК [3; 4; 5], о ее снижении [6], а также об отсутствии изменения уровня этих белков у больных с ЮИА по сравнению с контролем [7].

Наиболее часто ЦК исследуются в сыворотке крови. Однако это короткоживущие молекулы, действующие преимущественно локально в месте воспаления [8]. Одним из подходов, нивелирующим данные ограничения, является исследование ЦК в супернатантах клеточных культур, в том числе клеток периферической крови. Оценка спонтанной продукции ЦК клетками отражает уровень их предшествующей активации. Индуцированный различными стимуляторами синтез ЦК характеризует потенциальную способность клеток отвечать на внешний стимул.

Цель работы

Определение уровня спонтанной и стимулированной продукции провоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом.

Материалы и методы

Обследованы дети и подростки 2–17 лет с различными вариантами ЮИА: системный вариант (n=9); олигоартикулярный вариант (n=53); полиартикулярный вариант (n=21); артрит, ассоциированный с энтезитом (n=17), а также условно здоровые дети соответствующего возраста без признаков наличия аутоиммунных заболеваний (контроль, n=31). Образцы гепаринизированной крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 в соотношении 1:9, готовили контрольный образец без стимулятора и образец, стимулированный фитогемагглютинином (ФГА) в конечной концентрации 20 мкг/мл. Разведенную кровь инкубировали по 500 мкл (37°C, 5% CO₂) в течение 24 часов. После инкубации образцы центрифугировали 10 мин. при 1500 об./мин., отбирали супернатанты и однократно замораживали. Определение концентрации цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ИНФ-γ, ФНО-α) в супернатантах клеточных культур проводилось методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Для анализа данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Оценка уровня спонтанной и стимулированной продукции провоспалительных цитокинов у обследованных детей с артритом не выявила различий по концентрации ЦК между различными вариантами ЮИА. Это послужило основанием для объединения всех больных с ЮИА в одну группу для дальнейшего анализа.

Спонтанная продукция всех исследованных ЦК, кроме ИЛ-6, была выше у больных с ЮИА (табл.). Повышение концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови и других биологических жидкостях считается более характерным для системного варианта ЮИА [3], хотя другие авторы выявляли такое повышение и при поли- и олигоартикулярном вариантах [4]. Более интенсивная продукция клетками крови ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНОα и ИНФγ у больных с артритом по сравнению с контрольной группой отражает патогенетическую значимость данных ЦК при ЮИА. ИЛ-1β и ФНОα способны потенцировать костную деструкцию, деградацию хрящевой ткани путем активации клеток синовиальной и лимфоидной линий с последующим выделением медиаторов воспалительного процесса [8]. ИЛ-8 индуцирует привлечение нейтрофилов и усиливает степень выраженности местного воспаления, в том числе в синовиальной оболочке; ИНФγ выступает в роли макрофаг-активирующего фактора, стимулятора функциональной активности цитотоксических лимфоцитов и синтеза ФНОα [8].

Стимулированная продукция ФНОα и ИЛ-6 у обследованных нами детей с ЮИА была выше, чем в контрольной группе (табл.). В работах разных авторов отмечено увеличение концентрации этих ЦК в сыворотке крови и синовиальной жидкости больных с ЮИА [3; 4]. Продукция ИЛ-1β, ИЛ-8 и ИНФγ клетками крови после стимуляции ФГА у детей с артритом была существенно ниже, чем у здоровых детей (таблица). В одной из немногочисленных публикаций, посвященных исследованию продукции цитокинов клетками крови больных с ЮИА, отмечено увеличение выработки ИЛ-1β мононуклеарами периферической крови после стимуляции форболмеристилацетатом и иономицином [9]. В другой работе не выявлено разницы в продукции ИНФγ культурой моноцитов крови у пациентов с системным, олиго- и полиартикулярным вариантами ЮИА по сравнению с контролем [7].

Концентрация цитокинов (пг/мл) в супернатантах клеточных культур у больных с ЮИА и условно здоровых детей

ЦК	n	ЮИА		n	Контроль	
		Спонтанный	ФГА		Спонтанный	ФГА
ИЛ-1β	77	8,0* (1,0–23)	333,0** (166,0–463,0)	31	2,0 (0,0–8,0)	555,0 (263,0–670,0)
ИЛ-6	77	42,0 (20,0–190,0)	7660,0*** (5720,0–9800,0)	31	40,0 (20,0–150,0)	5005,0 (4165,0–5550,0)
ИЛ-8	93	244,0** (90,0–662,0)	1054,0** (938,0–1194,0)	31	84,0 (35,0–170,0)	1206,0 (986,0–1400,0)
ФНО-α	78	3,0*** (1,0–5,0)	306,0** (199,0–460,0)	31	0,4 (0,0–2,0)	250,0 (186,0–290,0)
ИНФ-γ	100	1,0* (0,0–47,0)	669,0*** (219,0–1310,0)	31	0,0 (0,0–4,0)	1432,0 (949,0–1778,0)

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$;

1 — данные представлены в виде: медиана (нижняя квартиль — верхняя квартиль);

2 — различия с контролем.

Сниженная продукция ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ИНФ γ при стимуляции ФГА у обследованных нами детей с ЮИА по сравнению со здоровыми детьми может указывать на истощение функциональных резервов клеток. Нами ранее выявлено, что увеличение экспрессии активационных маркеров CD69 и CD38 Т-лимфоцитами периферической крови в ответ на стимуляцию ФГА у больных с ЮИА было также существенно слабее, чем у здоровых детей [10]. Выявленные факты могут отражать недостаточность резервных возможностей иммунокомпетентных клеток в условиях хронического воспаления.

Выводы

Более интенсивная продукция клетками крови ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α и ИНФ γ у больных с артритом по сравнению с контролем отражает участие данных ЦК в патогенезе ЮИА. Снижение выработки ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ИНФ γ при стимуляции ФГА у детей с ЮИА по сравнению со здоровыми детьми свидетельствует об истощении функциональных резервов иммунокомпетентных клеток.

Литература

1. Руководство по аутоиммунным заболеваниям для врачей общей практики / под ред. И. Шенфельда, П. Л. Мерони, Л. П. Чурилова; пер. с англ. Л. П. Чурилова. — СПб.: Медкнига «ЭЛБИ», 2017. — 416 с.
2. Алексеева, Е. И. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения / Е. И. Алексеева, П. Ф. Литвицкий; под общ. ред. А. А. Баранова. — М.: ВЕДИ, 2007. — 368 с.
3. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels in the serum and synovial fluid in relation to bone mineral density and turnover in children with juvenile idiopathic arthritis / A. Gorska, O. Kowal-Bielecka, M. Urban, E. Pietrewicz // *Clinical immunology Centr. Eur. J. Immunol.* — 2008. — № 33 (4). — P. 216–219.
4. Proinflammatory cytokines in monitoring the course of disease and effectiveness of treatment with etanercept (ETN) of children with oligo- and polyarticular juvenile idiopathic arthritis (JIA) / D. Kaminiarczyk-Pyzalka, K. Adamczak, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mikos%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25291944 H. Mikos et al. // *Clinical Laboratory.* — 2014. — № 60 (9). — P. 1481–1490.
5. Clinical and laboratory features of macrophage activation syndrome / L. Guo, M. P. Lu, G. J. Dong et al. // *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics.* — 2017. — № 19 (2). — P. 188–192.
6. Pietrewicz, E. Cytokine levels in serum of patients with juvenile idiopathic arthritis depending on subtype and disease activity / E. Pietrewicz, M. Urban, A. Gyrka // *Pol Merkur Lekarski.* — 2004. — № 17 (99). — P. 232–234.
7. Lowered IL-4-producing T cells and decreased IL-4 secretion in peripheral blood from subjects with juvenile rheumatoid arthritis / J. L. Huang, M. L. Kuo, I. J. Hung et al. // *Chang Gung Medicine Journal.* — 2001. — № 24 (2). — P. 77–83.
8. Кетлинский, С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.
9. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis in systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade / V. Pascual, F. Allantaz, E. Arce, M. Purano // *J. of Exp. Medicine.* — 2005. — № 201. — P. 1479–1486.
10. Пашнина, И. А. Функциональное состояние лимфоцитов периферической крови при аутоиммунной патологии у детей: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / И. А. Пашнина. — Челябинск, 2016. — 46 с.

АССОРТИМЕНТНЫЙ ПРОФИЛЬ ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЯ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЙ УРАЛЬСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

УДК 616.15:612.275

А.Л. Петров, Г.А. Пономарев, Г.Н. Андрианова

Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

В статье проанализирована ассортиментная представленность лекарственных препаратов, произведенных фармацевтическими предприятиями УрФО. Обозначены перспективные с точки зрения импортозамещения сегменты. Показана перспективность дальнейшего развития промышленной фармацевтической клас-теризации в УрФО.

Ключевые слова: фармацевтический кластер, фармацевтический рынок, импортозамещение, инновации.