



УДК 616.61-036.12-085:611-018.74:546.172.6-03

УРОВЕНЬ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНАГРУЖЕННЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ В СОЧЕТАНИИ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

В.Ю. ГАЛЬЧИНСКАЯ
И.И. ТОПЧИЙ
П.С. СЕМЕНОВЫХ
Н.В. ЕФИМОВА
А.А. НЕСЕН

*ГУ «Институт терапии
имени Л.Т. Малой АМН Украины»,
г. Харьков*

e-mail: natal.efimova69@mail.ru

В статье изложены данные исследования липиднагруженных моноцитов и экспрессии CD14 у больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) в аспекте возможного развития проатерогенных осложнений при этой патологии. Повышение количества липиднагруженных моноцитов, отмечающееся во всех группах обследованных больных, имеет существенное значение для развития атеросклероза и свидетельствует об общих звеньях патогенетических механизмов ИБС и ХГН. Активация моноцитов у больных с коморбидной патологией является одним из наиболее ранних механизмов поражения почек и развития атеросклероза и может быть дополнительным фактором риска развития этих заболеваний.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, ишемическая болезнь сердца, лейкоциты, липиднагруженные моноциты, экспрессия CD14.

Нефрогенную дислиппротеидемию можно рассматривать с позиции одного из неиммунных механизмов прогрессирования заболевания почек и одновременного развития сердечно-сосудистых осложнений [1-4]. Причины возникновения, пути и следствия реализации проатерогенных нарушений липидного обмена у больных с хронической болезнью почек (ХБП) изучены недостаточно [5-7]. Для метаболизма липидов особое значение имеет их транспорт лейкоцитами, в частности моноцитами. Данный процесс может осуществляться не только после фагоцитоза липидов, но и путем фиксации соединений, содержащих липиды (липопротеиды высокой и низкой плотности, атерогенные иммунные комплексы и т.д.) на поверхностных мембранах клеток [8-10].

Следует отметить, что моноциты не только поглощают липиды из внешней среды, но и самостоятельно синтезируют их, для этого в клетках есть необходимый набор ферментов. Ухудшение жизнеспособности клеток или увеличение количества липидов в крови может привести к нарастанию содержания липидов [11].

В целом на основании данных литературы можно считать, что накопление жировых соединений в моноцитах является следствием или повышенного содержания липидов в крови (с усилением их фагоцитоза и транспорта), или возрастания внутриклеточного синтеза липидов с одновременным снижением липолитической активности, или дегенерации (старения) клеток. У больных как с атеросклерозом, так и с ХБП, очевидно, нельзя исключить одновременное действие всех вышеуказанных причин. В связи с этим особое значение приобретает популяционный состав липиднагруженных лейкоцитов, который дифференцируют в зависимости от экспрессии на поверхности клеток определенных антигенов. К ним относят и маркер активации моноцитов CD14. Этот антиген представляет собой мультилигандный рецепторный комплекс и играет важную роль в иммунных ответах, функционируя как рецептор для липополисахаридов и как триггер активации моноцитов [12, 13]. Кроме липополисахаридов, CD14 также связывает и другие бактериальные продукты: эндотоксин, пептидогликаны, белки теплового шока, керамиды, анионные фосфолипиды и т.д. [14, 17].

Цель данного исследования – изучение количества липиднагруженных моноцитов и экспрессии CD14 у больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) в аспекте возможного развития проатерогенных осложнений при этой патологии.



Материалы и методы. Было обследовано 132 пациента в возрасте от 19 до 70 лет, которых в зависимости от установленного диагноза распределили на 3 группы. В первую группу вошло 48 больных с ХГН в сочетании с ишемической болезнью сердца (ИБС), вторая группа состояла из 52 пациентов с ХГН. 32 человека с ИБС составили третью группу. Контроль – 20 здоровых доноров.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из периферической крови путем градиентного центрифугирования с использованием фиколл-верографина ($\rho=1,077$ г/мл).

Содержание липиднагруженных лейкоцитов в периферической крови определяли гистохимическим методом с использованием Судана черного по Лилли-Бартнеру. Экспрессию CD14 моноцитами изучали непрямым иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител к CD14 производства ТОО «Сорбент» (Россия).

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерных программ «SPSS 13». Проверку распределения дат на соответствие нормальному закону проводили с использованием метода Шапиро-Уилко. Статистические гипотезы о разнице средних проверяли с использованием критерия Стьюдента для уровня значимости $P<0,05$. Данные представлены как среднее значений, измеряемых в двух параллельных пробах (\bar{X}), и стандартная ошибка ($S\bar{X}$).

Результаты и их обсуждение. При ХГН развиваются разнообразные нарушения липидного обмена, а присоединение вторичной гипертензии или появление признаков хронической почечной недостаточности всегда приводит к выраженным сдвигам в показателях липидного обмена [1, 7, 9]. Вместе с тем нельзя исключить, что большая распространенность сердечно-сосудистых нарушений у больных ХГН обусловлена не только высоким содержанием липидов в крови, но и проатерогенными нарушениями их метаболизма, связанными с процессами воспаления и сбоями в минеральном обмене – основными риск-факторами ХБП [4, 8, 10].

Анализ эпидемиологических данных позволяет предположить, что дислипидемия может быть фактором риска прогрессирования почечной недостаточности [6]. У больных с изолированным мочевым синдромом нарушения липидного обмена обнаруживаются в 24% случаев, при вторичной гипертензии – у 41%, при нефротическом синдроме – у 100%, на стадии развития ХПН – у 87%. Особенно выражены нарушения липидного обмена у пациентов с сахарным диабетом или нефротическим синдромом [5]. При нарушении функции почек выявлена U-подобная зависимость между уровнем холестерина и летальностью [2].

Несмотря на наличие некоторых дискуссионных моментов, не вызывают сомнения данные об избыточном содержании липидов в моноцитах крови больных атеросклерозом. Кроме того, ХГН, который способствует развитию атеросклеротических осложнений, также сопровождается увеличением содержания липидов в моноцитах [7, 9].

Мы исследовали количество липиднагруженных моноцитов у больных ХГН в сочетании с ИБС, у больных с ИБС и у здоровых доноров, используя цитохимический метод. Как свидетельствуют полученные результаты, наиболее высокое содержание липиднагруженных моноцитов выявлено в крови больных ХГН на фоне ИБС (рис. 1). В частности, содержание липиднагруженных клеток при ИБС и при ХГН составляло $(60,34\pm 6,22)\%$ и $(56,92\pm 5,38)\%$ соответственно. Количество липиднагруженных моноцитов при сочетанной патологии $(63,74\pm 6,14)\%$, контроль – $(43,68\pm 4,16)\%$.

Следует отметить, что количество липиднагруженных моноцитов во всех группах обследованных больных было достоверно выше, чем в контрольной группе ($p<0,05$).

Приведенные результаты согласовываются с данными, полученными как у больных с атеросклерозом, так и при других патологических состояниях [2, 9]. Так, максимальное количество липофагоцитов, общих липидов и холестерина выявлено в крови больных на сахарный диабет в сочетании с ожирением. Не вызывает сомнения, что накопление липидов в лейкоцитах имеет особое значение для атеросклероза, так как внутриклеточные липиды при определенных условиях становятся основой атеромы, постоянного морфологического признака атеросклероза [7, 8, 10].



По данным литературы, у больных сахарным диабетом в сочетании с ожирением и у больных с коронарным атеросклерозом отмечается наиболее выраженная гиперхолестеринемия [5, 8]. Более высокие показатели липидемии при ИБС в сравнении с ХГН, на первый взгляд, должны способствовать и более высокому содержанию липофагоцитов. Вместе с тем, как показали полученные нами результаты, у больных с ИБС по сравнению с больными ХГН количество липиднагруженных моноцитов существенно не отличается ($p > 0,05$).

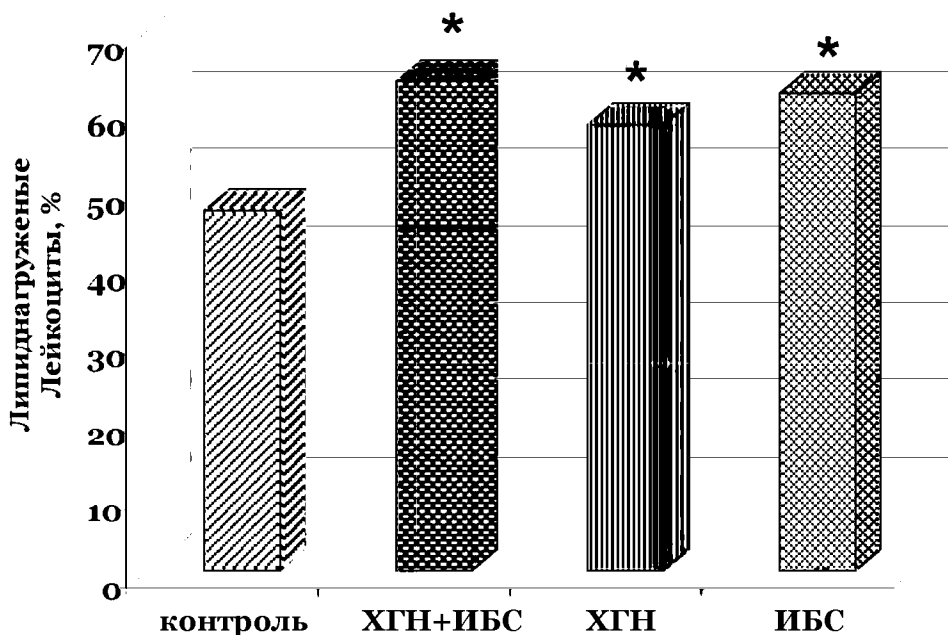


Рис. 1. Количество липиднагруженных моноцитов у обследованных больных и здоровых доноров.

Примечание.* – различия между показателями у больных и здоровых статистически достоверны ($p < 0,05$)

Как известно, артериальная гипертензия и микроальбуминурия принадлежат к основным риск-факторам развития сердечно-сосудистых осложнений, наличие которых может отображать генерализованную эндотелиальную дисфункцию, anomalies гемостаза, быть маркером воспалительного процесса и способствовать повреждению органов-мишеней, в частности артерий. При этом возникают микронекрозы с продуктами белкового распада и отложениями фибрина. Фагоцитарные клетки (в основном мононуклеары) поглощают и расщепляют их. Кроме того, эти клетки продуцируют коллаген, принимая участие в заживлении соответствующих повреждений. Очевидно, указанные обстоятельства наряду с накоплением липидов в клетках, в определенной мере способствуют истощению возможностей фагоцитарных клеток реагировать на гиперлипидемию адекватным поглощением липидов. Недостаточное повышение в крови содержания липофагоцитов на фоне высоких значений гиперлипидемии может быть неблагоприятным признаком, который указывает на снижение функций системы защиты от перегрузки крови липидами. Диагностическое значение найденных взаимосвязей между концентрацией в крови атерогенных липопротеидов и количеством фагоцитов может быть двойным. С одной стороны, избыток липофагоцитов может быть признаком повышенного количества атерогенных липопротеидов в крови, т.е. свидетельством неблагоприятных нарушений в обмене веществ, присущих атеросклерозу. С другой стороны, избыток липофагоцитов можно рассматривать как показатель достаточной активности фагоцитарных клеток, направленной на устранение возникшей гиперлипидемии, что может быть признаком высокой интенсивности реакций иммунитета.

На наш взгляд, количество липиднагруженных моноцитов должно быть адекватным высоким уровням атерогенных липидов. Низкая корреляция между высокими значениями холестерина ЛПНП и количеством липиднагруженных моноцитов может свидетельствовать об истощении моноцитов в плане фагоцитарной и транспортной активности.



Повышение количества липиднагруженных моноцитов, отмечающееся во всех группах обследованных больных, имеет существенное значение для развития атеросклероза и свидетельствует об общих звеньях патогенетических механизмов ИБС и ХГН.

Дополнительные нарушения липидного метаболизма при ХГН, состоящие в развитии дислипидемии и нарушении транспорта липидов, безусловно, оказывают содействие развитию сосудистых атеросклеротических изменений. Выяснение аномалий липидного метаболизма может обуславливать применение специфической антилипидной терапии.

Для развития атеросклероза, вероятно, не настолько важны причины перегрузки лейкоцитов липидами, насколько их последствия. Не исключено, что лейкоцит, перегруженный липидами из-за потери собственной жизнеспособности, представляет по отношению к липоидозу артерий большую угрозу, чем здоровый лейкоцит, но с избытком нагруженный липидами в процессе выполнения своей обычной физиологической функции.

Общий уровень активации моноцитов отражает экспрессия на их поверхности CD14 антигена. Выраженная экспрессия CD14 отмечена на поверхности моноцитов и большинства тканевых макрофагов, слабая – на гранулоцитах. Связывание лигандов с CD14 приводит к активации клеток и выделению ими цитокинов и экспрессии молекул адгезии [18]. CD14 также был выявлен в циркулирующей растворимой форме (sCD14) [11]. Отмечено существенное повышение экспрессии мембраносвязанного CD14 моноцитами у больных сахарным диабетом [12]. Повышение sCD14 выявлено при многочисленных патологиях, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, атопический дерматит, заболевания печени и атеросклероз [14-17]. Очевидно, все эти данные указывают на важную роль CD14 в заболеваниях, ассоциированных с воспалением и атеросклеротическими сердечно-сосудистыми нарушениями. В связи с вышесказанным мы изучали экспрессию CD14 на мононуклеарах крови больных ХГН и определяли возможную ее корреляцию с количеством липиднагруженных клеток. Выполненное нами исследование, выявило существенное превалирование CD14 положительных клеток у больных ХГН и ИБС по сравнению с контрольной группой (рис. 2). В частности, содержание CD14+клеток при ИБС и при ХГН составляло (78,42±7,45)% и (72,42±8,62)% соответственно. Количество CD14+моноцитов при сочетанной патологии – (79,64±7,14)%, контроль – (61,98±5,87)%.

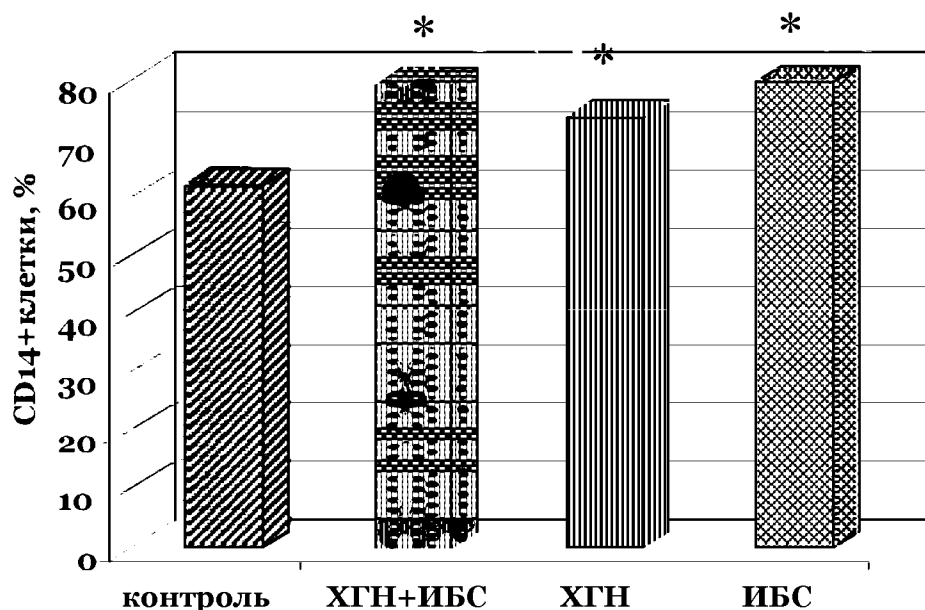


Рис. 2. Процентное содержание CD14 положительных клеток у обследованных больных и здоровых доноров.

Примечание: * – различие между показателями у больных и здоровых статистически достоверно (p < 0,05)



Как отмечалось выше, большинство инфекционных и воспалительных заболеваний сопряжено с повышенной экспрессией CD14. По сути CD14 положительные клетки представляют собой активированные моноциты. Как известно, эти клетки имеют принципиальное значение в реализации процессов воспаления и иммунитета из-за непосредственного участия в фагоцитозе, экспрессии антигенов и продукции цитокинов [12, 19, 20]. Последнее вполне согласовывается с полученными в этом исследовании данными о возрастании экспрессии CD14 при ХГН, ИБС и при сочетанной патологии.

Кроме того, в нашем исследовании была выявлена прямая корреляционная связь между количеством CD14 положительных клеток и содержанием липиднагруженных лейкоцитов у больных ХГН на фоне ИБС ($r=+0,76$, $p<0,01$).

Таким образом, увеличение экспрессии CD14 можно рассматривать как признак повышенной активности клеток, и если этот признак сопровождается увеличенным количеством липиднагруженных лейкоцитов, то можно предполагать, что между этими явлениями существует не только статистическая, но и причинно-следственная связь.

Нарушение моноцитарного клиренса липидов при хронической болезни почек нашло подтверждение в экспериментальных исследованиях, выполненных на мышах с односторонней нефроэктомией. Последняя, существенным образом не повлияв на ренальную функцию, приводила к повышенному содержанию моноцитов/макрофагов в очагах атеросклеротических поражений и резкому возрастанию миграции в ответ на моноцитарный хемоаттрактантный фактор на фоне супрессии моноцитарного белка переносчика липидов A1, т. е. на фоне снижения выхода липидов из клеток.

Механизмы развития сердечно-сосудистой патологии при хронических заболеваниях почек представляются чрезвычайно важными и подвергаются интенсивному анализу в аспекте комбинированных эффектов традиционных и специфических для ХБП атерогенных факторов риска, которые включают воспаление и метаболизм липидов. Однако традиционные факторы риска не могут в полной мере объяснить высокую частоту ИБС при почечной недостаточности. Поэтому, наряду с традиционными факторами риска, следует рассматривать также специфические факторы, которые ассоциируются с нарушением функции почек.

Активация моноцитов у больных ХГН и ИБС является одним из наиболее ранних механизмов поражения почек и развития атеросклероза и может быть дополнительным фактором риска развития этих заболеваний.

Выводы. Количество липиднагруженных моноцитов во всех группах обследованных больных достоверно выше, чем в контрольной группе, при этом наиболее высокое содержание липиднагруженных моноцитов выявлено при сочетанной патологии.

1 Уровень экспрессии CD14 мононуклеарными лейкоцитами существенно возрастает у больных ХГН, ИБС и сочетанной патологией по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о повышенной активации этих клеток.

2 Выявлена прямая корреляционная связь между количеством CD14 положительных клеток и содержанием липиднагруженных лейкоцитов у больных ХГН на фоне ИБС.

3 Повышение количества липиднагруженных моноцитов и возрастание их активации, отмечающееся во всех группах обследованных больных, имеет существенное значение для развития атеросклероза и свидетельствует об общих звеньях патогенетических механизмов ИБС и ХГН.

Литература

1. Беляев, Ф.И. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и хроническая почечная недостаточность (обзор) / Ф.И. Беляев // Кардиология. – 2005. – № 7. – С. 92-96.
2. Deo, R. Health ABC study: Kidney dysfunction and fatal cardiovascular disease: An association independent of atherosclerotic events: results from the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) study / R. Deo, C.L. Fyr, L.F. Fried et al. // Am. Heart. J. – 2008. – V. 155 – P. 62-68.



3. Parikh, N.I. Chronic Kidney Disease as a Predictor of Cardiovascular Disease (From the Framingham Heart Study) / N.I. Parikh, S.-J. Hwang, M.G. Larson et al. // *Am. J. Cardiol.* – 2008. – V. 102 (1) – P. 47-53.
4. McCullough, P.A. Kidney Early Evaluation Program Investigators: CKD and cardiovascular disease in screened high-risk volunteer and general populations: The Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2004 / P.A. McCullough, S. Li, C.T. Jurkowitz et al. // *Am. J. Kidney Dis.* – 2008. – V. 51 (Suppl. 2). – P. 38-45.
5. Whaley-Connell, A.T. Kidney Early Evaluation Program Investigators: Diabetes mellitus in CKD: Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2004 / A.T. Whaley-Connell, J.R. Sowers, S.I. McFarlane et al. // *Am. J. Kidney Dis.* – 2008. – V. 51 (Suppl. 2). – P. 21-29.
6. Vassalotti, J.A. Kidney Early Evaluation Program Investigators: Trends in mineral metabolism: Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2004 / J.A. Vassalotti, J. Uribarri, S.C. Chen et al. // *Am. J. Kidney Dis.* – 2008. – V. 51 (Suppl. 2). – P. 56-68.
7. Yamamoto, S. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction / S. Yamamoto, V. Kon // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2009. – V. 18 (3) – P. 181-188.
8. Nickolas, T.L. The Association between Kidney Disease and Cardiovascular Risk in a Multiethnic Cohort Findings from the Northern Manhattan Study (NOMAS) / T.L. Nickolas, M. Khatri, B. Boden-Albala et al. // *Stroke* – 2008. – V. 39 – P. 2876-2879.
9. Schiffrin, E.L. Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system / E.L. Schiffrin, M.L. Lipman, J.F. Mann // *Circulation.* – 2007. – V. 116 – P. 85-97.
10. Noshad, H. Arterial Atherosclerosis in Patients With Chronic Kidney Disease and Its Relationship With Serum and Tissue / H. Noshad, H. Argani, N. Nezami et al. // *Iranian Journal of Kidney Diseases.* – 2009, October. – V. 3(4). – P. 203-209.
11. Gordon, S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids / S. Gordon // *J Clin Invest.* – 2007. – V. 117. – P. 89-53
12. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation / L. Ziegler-Heitbrock // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – V. 81(3) – P. 584-592. Старикова, Е.А. Особенности адгезии к эндотелиальным клеткам субпопуляций CD14+16+ и CD14+16- моноцитов человека. / Е.А. Старикова, А.М. Лебедева, И.С. Фрейдлин // *Цитология.* – 2010. – Т. 52, № 5. – С. 380-383.
14. Subimerb, C. Circulating CD14(+)CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma / C. Subimerb, S. Pinlaor, V. Lulitanond et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2010, September; 1 – V. 61(3) – P. 471-479.
15. Takeyama, N. Selective expansion of the CD14(+)/CD16 (bright) subpopulation of circulating monocytes in patients with hemophagocytic syndrome / N. Takeyama, T. Yabuki, T. Kumagai et al. // *Ann Hematol.* – 2007. – V. 86(11) – P. 787-792,
16. Ulrich, C. Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients / C. Ulrich, G.H. Heine, M.K. Gerhart et al. // *Am. J. Transplant.* – 2008. – V. 8(1) – P. 103-110.
17. Tsujioka, H. Post-Reperfusion Enhancement of CD14(+)/CD16(-) Monocytes and Microvascular Obstruction in ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction / H. Tsujioka, T. Imanishi, H. Ikejima et al. // *Circ J.* – 2010. – V. 74(6) – P. 1175-1182.
18. Skrzeczyńska-Moncznik, J. Peripheral blood CD14 high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. Scand / J. Skrzeczyńska-Moncznik, M. Bzowska, S. Loseke et al. // *J. Immunol.* – 2008. – V. 67(2) – P. 152-159.
19. Barisione, C. CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients / C. Barisione, S. Garibaldi, G. Ghigliotti et al. // *Dis. Markers.* – 2010. – V. 28 (2) – P. 115-124.
20. Mosig, S. Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14+CD16+ monocytes in detoxification of oxidized LDL / S. Mosig, K. Rennert, S. Krause et al. // *The FASEB Journal.* March. – 2009. – V. 23 (3) – P. 866-874.



LEVEL AND PHENOTIPIC PECULIARITIES OF LIPID LOADED LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS IN COMBINATION WITH CORONARY HEART DISEASE

V.Yu. GALCHINSKAYA

I.I. TOPCHIY

P.S. SEMENOVYKH

N.V. EFIMOVA

A.A. NESEN

SI "Institute of Therapy named after L.T. Malaya of NAMS of Ukraine", Kharkov

e-mail: natal.efimova69@mail.ru

The data of lipid-loaded monocytes and CD14 expression investigation in patients with chronic glomerulonephritis (CGN) in aspect of possible development of pro-atherogenic complications in this pathology are stated in this article. The lipid-loaded monocytes quantity increase, being noted in all patient groups, has essential value for the development of atherosclerosis and testifies to the general links of the coronary heart disease and CGN pathogenic mechanisms. Monocytes activation in patients with combined pathology is one of the earliest mechanisms of kidney injury and development of atherosclerosis and may be an additional risk factor of development of these diseases.

Key words: chronic glomerulonephritis, coronary heart disease, leukocytes, lipid-loaded monocytes, CD14 expression.