

УДК 616.858

А.Ш. ОРАДОВА, Г.О. УСТЕНОВА, Г.С. СТАБАЕВА

Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОКИНОВ (обзорная статья)



Орадова А.Ш.

В этом обзоре уделено большое внимание ключевым и актуальным в настоящее время вопросам содержания цитокинов в различных биологических жидкостях в оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток и регуляции иммунного ответа.

Ключевые слова: цитокины, иммунохимия.

Цитокины в настоящее время рассматривают как белковопептидные молекулы, продуцируемые различными клетками организма и осуществляющие межклеточные и межсистемные взаимодействия. Цитокины – универсальные регуляторы жизненного цикла клеток, они контролируют процессы дифференцировки, пролиферации, функциональной активации и апоптоза последних.

Цитокины, продуцируемые клетками иммунной системы, называют иммуноцитокинами; они представляют собой класс растворимых пептидных медиаторов иммунной системы, необходимых для ее развития, функционирования и взаимодействия с другими системами организма (Ковальчук Л.В. и соавт., 1999).

Являясь регуляторными молекулами, цитокины играют важную роль в осуществлении реакций врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивают их взаимосвязь, контролируют гемопоэз, воспаление, заживление ран, образование новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и многие другие жизненно важные процессы.

В настоящее время существует несколько различных классификаций цитокинов, учитывающих их строение, функциональную активность, происхождение, тип цитокиновых рецепторов. Традиционно, в соответствии с биологическими эффектами, принято выделять следующие группы цитокинов.

1) Интерлейкины (ИЛ-1 – ИЛ-18) – секреторные регуляторные белки иммунной системы, обеспечивающие медиаторное взаимодействие в иммунной системе и связь ее с другими системами организма;

2) Интерфероны (ИФНа, ИФНβ, ИФНγ) – противовирусные белки с выраженным иммунорегуляторным и противоопухолевым действием;

3) Факторы некроза опухоли (ФНОα, ФНОβ – лимфотоксин) – цитокины с цитотоксическим и регуляторным действием;

4) Колонистимулирующие факторы (КСФ) – стимуляторы роста и дифференцировки гемопоэтических клеток (ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ);

5) Хемокины – хемоаттрактанты для лейкоцитов;

6) Факторы роста – регуляторы роста, дифференци-

ровки и функциональной активности клеток различной тканевой принадлежности (фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелиальных клеток, фактор роста эпидермиса) и трансформирующий фактор роста – ТФРβ.

Цитокины различаются по строению, биологической активности и ряду других признаков, однако обладают общими свойствами, характерными для данного класса пептидов. Как правило, цитокины представляют собой гликозилированные полипептиды средней молекулярной массы (менее 30 kD). Цитокины вырабатываются активированными клетками в низкой концентрации непродолжительное время, при этом их синтез всегда начинается с транскрипции генов. Свое биологическое действие на клетки цитокины оказывают через рецепторы на поверхности клеток-мишеней. Связывание цитокинов с соответствующим рецептором приводит к активации клеток, их пролиферации, дифференцировке или гибели. Цитокины оказывают свое биологическое действие преимущественно локально, работая по принципу сети. Они могут действовать согласованно и вызывать каскадную реакцию, последовательно индуцируя синтез одних цитокинов другими. Такое комплексное взаимодействие цитокинов необходимо для формирования воспаления и регуляции иммунных реакций. Примером синергического взаимодействия цитокинов является стимуляция воспалительных реакций ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО, а также синтеза IgE совместным действием ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13. Антагонистическое взаимодействие цитокинов также может быть негативным регуляторным механизмом контроля развития воспалительной реакции и синтеза провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (торможение продукции ИЛ-6 в ответ на увеличение концентрации ФНО). Цитокиновая регуляция функций клеток-мишеней может осуществляться по аутокринному, паракринному или эндокринному механизму.

Система цитокинов включает клетки-продуценты; растворимые цитокины и их антагонисты; клетки-мишени и их рецепторы.

Клетки-продуценты:

I. Основную группу клеток-продуцентов цитокинов в иммунной системе составляют лимфоциты.

Th0 вырабатывают широкий спектр цитокинов в очень низких концентрациях.

Th1 продуцируют ИЛ-2, ИФН γ , ИЛ-3, ФНО α , необходимые для развития реакций клеточного иммунитета (ГЗТ, противовирусной, противоопухолевой цитотоксичности и др.).

Набор цитокинов, секретируемых Th2 (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-3), определяет развитие гуморального иммунного ответа.

В последние годы описана субпопуляция Th3, вырабатывающих ТФР β , который суппрессирует функцию как Th1, так и Th2.

T-цитотоксические (CD8+), В-лимфоциты, естественные киллеры являются слабыми продуцентами цитокинов.

II. Клетки макрофагально-моноцитарного ряда продуцируют цитокины, инициирующие иммунный ответ и участвующие в реакции воспаления и регенерации.

III. Клетки, не относящиеся к иммунной системе: клетки соединительной ткани, эпителия, эндотелия спонтанно, без антигенной стимуляции, секретируют цитокины, поддерживающие пролиферацию гемопоэтических клеток, и аутокринные факторы роста (ФРФ, ЭФР, ТФР β и др.) [1–9].

Иммунный статус – это комплексный показатель состояния иммунной системы, это количественная и качественная характеристика состояния функциональной активности органов иммунной системы и некоторых неспецифических механизмов противомикробной защиты.

Методы определения цитокинов

Определение содержания цитокинов в различных биологических жидкостях имеет большое значение в оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток и регуляции иммунного ответа. В отдельных случаях (септический шок, бактериальный менингит), когда цитокины, в частности ФНО α , выступают в качестве ведущего фактора патогенеза, определение его содержания в крови или спинномозговой жидкости становится основным методом иммунологической диагностики. Иногда уровень цитокинов определяют с целью дифференциальной диагностики. Например, при бактериальном менингите в спинномозговой жидкости определяется ФНО α , а при вирусных менингитах в ней обнаруживается, как правило, только ИЛ-1. Однако определение присутствия цитокинов в сыворотке крови и других биологических жидкостях может давать отрицательные результаты в связи с особенностями этих пептидов. Являясь в основном короткоживущими регуляторами, цитокины имеют небольшой полупериод жизни (до 10 мин). Некоторые цитокины содержатся в крови в крайне низких концентрациях, накапливаясь в основном в очаге воспаления, кроме того, биологическая активность цитокинов может маскироваться при связывании их с молекулами ингибиторов, циркулирующих в крови.

Существуют три различных подхода к количественному определению цитокинов: иммунохимический (ИФА), биотестирование и молекулярно-биологические тесты.

Биологическое тестирование – самый чувствительный метод, но по специфичности уступает ИФА. Различают 4 разновидности биотестирования: по цитотоксическому

эффекту, по индукции пролиферации, по индукции дифференцировки и по противовирусному эффекту. По способности индуцировать пролиферацию клеток-мишеней проводят биотестирование следующих цитокинов: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7. По цитотоксическому действию на чувствительные клетки-мишени (L929) тестируют TNF-а и TNF-р. IFN-у тестируют по способности индуцировать экспрессию молекул HLA II на клетках-мишенях. ИЛ-8 тестируют по способности усиливать хемотаксис нейтрофилов. Биотесты используются больше с исследовательскими целями или для подтверждения результатов ИФА [22–30].

Более широкое распространение получило определение цитокина в сыворотке крови и других биологических материалах с помощью твердофазного ИФА. Исследование проводится в соответствии с протоколом, прилагаемом к диагностической тест-системе. Чаще всего применяют вариант сендвич-ELISA, заключающийся в следующем: один тип МКАТ к определенному цитокину иммобилизуется на внутренней поверхности ячеек планшетов для исследования. В лунки планшета вносят исследуемый материал и соответствующие стандарты и контроли. После инкубации и промывки в лунки вносят вторые МКАТ к другому эпиптопу данного цитокина, конъюгированные с индикаторным ферментом (пероксидазой хрена). После инкубации и промывки в ячейки вносят субстрат – перекись водорода с хромогеном. В процессе ферментативной реакции изменяется интенсивность окраски лунок, которую измеряют на автоматическом фотометре для планшетов.

ИФА с применением МКАТ против отдельных эпиптопов в молекуле цитокинов отличается высокой чувствительностью и специфичностью, кроме того, преимуществом метода является объективный автоматизированный учет результатов. Однако этот метод также не лишен недостатков, так как обнаружение присутствия молекул цитокинов еще не является показателем их биологической активности, возможность ложноположительных результатов из-за перекрестно реагирующих антигенных эпиптопов, использование ИФА не дает возможности определения цитокинов в составе иммунных комплексов.

ИФА отличается от биотестирования более низкой чувствительностью при высокой специфичности и воспроизводимости. Цитокин выявляется за счет его способности связываться с двумя разными моноклональными антителами, направленными против двух разных антигенных эпиптопов в молекуле цитокина. Используется, например, комплекс стрептавидин – фермент – субстрат фермента. Однако способность большинства цитокинов образовывать комплексы с сывороточными белками и т.п. может существенно исказить результаты количественного определения уровней цитокинов.

Молекулярно-биологические методы позволяют определить экспрессию цитокиновых генов в исследуемом материале, т.е. присутствие соответствующей мРНК. Наиболее чувствительной считается обратная транскриптаза полимеразная цепная реакция (RT-PCR). Обратная транскриптаза (ревертаза) используется для получения сДНК копий с мРНК, выделенной из клеток. Количество сДНК отражает исходное количество мРНК и косвенно отражает

активность продукции данного цитокина. Изучение продукции цитокинов в культурах цельной крови или выделенных из крови мононуклеаров позволяет охарактеризовать секреторную активность моноцитов крови, индуцированную митогенами: Кон А, ФГА, ЛПС. Интерпретация данных в динамике позволяет прогнозировать дальнейшее течение при органоспецифических аутоиммунных заболеваниях, при рассеянном склерозе, при оценке эффективности применяемых методов иммунотерапии опухолей и т.д.

Тестирование по биологическим эффектам, как правило, недостаточно чувствительно и иногда недостаточно информативно. Присутствие в той же биологической жидкости молекул ингибиторов или антагонистов может маскировать биологическую активность цитокинов. При этом нередко разные цитокины проявляют одинаковую биологическую активность [10-22]. Кроме того, постановка биологических тестов требует специального дополнительного оснащения, проводится в нестандартных условиях и используется преимущественно в научно-исследовательских целях.

Выводы

Таким образом, в настоящее время не вызывает сомнения, что цитокины являются важнейшими факторами иммунопатогенеза. Изучение уровня цитокинов позволяет получить информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток, соотношении процессов активации Т-хелперов I и II типов, что очень важно при дифференциальной диагностике ряда инфекционных и иммунопатологических процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Гумилевская О.П., Гумилевский Б.Ю., Антонов Ю.В. Способность лимфоцитов периферической крови больных поллинозом секретировать IL-4, INF при поликлональной стимуляции *in vitro* // Цитокины и воспаление: Материалы международной научно-практической школы – конференции. – СПб., 2002. – Т. 1. – С. 94
- 2 Булина О.В., Калинина Н.М. Анализ параметров цитокинового звена иммунитета у детей, страдающих атопическим дерматитом // Цитокины и воспаление. М.: Медицина, 2002. – № 2. – С. 92
- 3 Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В. Цитокинотерапия рекомбинантным интерлейкином-2 (ронколейкином) у больных с вирусным гепатитом // Цитокины и воспаление. М.: Медицина, 2002. – № 4. – С. 43–66
- 4 Marty C., Misset B., Tamion F. et al. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin // *Critical Care Medicine*. – 1994. – V. 22. – P. 673-679
- 5 Шаимова В.А., Симбирцев, Котов А.Ю. Провоспалительные цитокины при различных типах течения гнойной язвы роговицы // Цитокины и воспаление. Материалы международной научно-практической школы – конференции. – 2002. – Т. 1, №2. – С. 52
- 6 Teitelbaum S.L. Bone resorption by osteoclasts // *Science*. – 2000. – V. 289. – P. 1504–1508
- 7 Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 2002. – 736 с.
- 8 Иммунология // Под ред. У. Пола (пер. с англ.), 1, 2, 3 том. – М.: Мир, 1987
- 9 Иммунологические методы // Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
- 10 Клиническая иммунология // Под ред. А.В. Караулова. – М.: Медицинское информационное агентство, 1999. – 604 с.
- 11 Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность. – М.: Медицинская книга, 2003. – 240 с.
- 12 Лимфоциты. Методы. // Под ред. Дж. Клауса (пер. с англ.). – М.: Мир, 1990. – 214 с.
- 13 Меньшиков И.В., Берулова Л.В. Основы иммунологии: Лабораторный практикум. – Ижевск: ИД Удмуртский ун-т, 2001. – 136 с.
- 14 Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1987. – 329 с.
- 15 Ройт А. Основы иммунологии. – М.: Мир, 1991. – 327 с.
- 16 Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. 1, 2 том. – Санкт-Петербург: Наука, 2000. – 321 с.
- 17 Стефании Д.В., Вельтищев Ю.Е. Клиническая иммунология детского возраста. – М.: Медицина, 1996. – 383 с.
- 18 Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. 3, 4 том. – СПб: Наука, 2001. – 391 с.
- 19 Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорова И.Г. Иммунология. – М.: Медицина, 2000. – 430 с.
- 20 Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. – М.: ВНИРО, 1995. – 219 с.
- 21 Беляева О.В., Кеворков Н.Н. Влияние комплексной терапии на показатели местного иммунитета больных пародонтитом // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 4. – С. 34–37
- 22 Chang Y.T., Chou C.T., Yu C.W. et al. Cytokine gene polymorphisms in Chinese patients with psoriasis // *Br J Dermatol*. – 2007 May. – Vol.156, №5. – P. 899-905
- 23 Baran W, Szepietowski JC, Mazur G, Baran E. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms in psoriasis vulgaris // *Acta Derm Venereol*. – 2008. – Vol. 88. – P. 113-116
- 24 Borska L, Fiala Z, Krejssek J, Andrys C, Vokurkova D, Hamakova K, Kremlacek J, Ettler K. Immunologic changes in TNF-alpha, sE-selectin, sP-selectin, sICAM-1, and IL-8 in pediatric patients treated for psoriasis with the goeckerman regimen // *Pediatric Dermatology*. – 2007. – Vol. 24, № 6. – P. 607-612
- 25 O'Kane M., Markham T., McEvoy A.N., Fearon V., Veale D.J., Fitzgerald O., Kirby B., Murphy E.P. Increased expression of the orphan nuclear receptor NURR1 in psoriasis and modulation following TNF-a inhibition / M. O'Kane [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2008. – Vol. 128. – P. 300-310
- 26 Fiorino G., Allez M., Malesci A., Danese S. Review article: anti TNF-a induced psoriasis in patients with inflammatory bowel disease // *Aliment Pharmacol Ther*. – 2009. – Vol. 29. – P. 921-927
- 27 Tobin AM, Kirby B. TNFa inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis // *Biodrugs*. – 2005. – Vol. 19, №1. – P. 47-57
- 28 Serwin AB et al. Tumour necrosis factor alpha (TNF-a) converting enzyme and soluble TNF-a receptor

type 1 in psoriasis patients in relation to the chronic alcohol consumption // *Journal European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2008. – Vol. 22. – P. 712-717

29 Arican O. et al. Serum levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity // *Mediators of Inflammation*. – 2005. – Vol. 5. – P. 273-279

30 Mastroianni A. et al. Cytokine profiles during infliximab monotherapy in psoriatic arthritis // *British Journal of Dermatology*. – 2005. – Vol. 153. – P. 531-536

Т Ұ Ж Ы Р Ы М

А.Ш. ОРАДОВА, Г.О. УСТЕНОВА, Г.С. СТАБАЕВА

С.Ж. Асфендияров атындағы қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы қ.

ЦИТОКИН ЗЕРТТЕУ ӨДІСТЕР

Шолуы бұл үлкен назар маңызды бөлінген және сұрақ көкейкесті қазіргі уақытта әр түрлі биологиялық сұйықтықтарда иммун құзырлы жасушаларды функционалдық белсенділікті бағалауда цитокиндердің мазмұнию және иммунді жауаптың реттеуі.

Негізгі сөздер: цитокин, иммунитетке қатысты химия.

S U M M A R Y

A.S. ORADOVA, G.O. USTENOVA, G.S. STABAEVA

Kazakh national medical university

n.a. S.D. Asfendiyarov, Almaty c.

RESEARCH METHODS OF CYTOKINES

In this review, paid great attention to critical and emerging issues currently cytokine content in various biological fluids in the assessment of the functional activity of immune cells and the regulation of the immune response.

Key words: cytokines, immunochemistry.