

УДК 616.61-036.12-092:611-018.74

**И.И.ТОПЧИЙ, А.Н.КИРИЕНКО, М.М.ДУНАЕВСКАЯ,  
Е.Н.ЩЕНЯВСКАЯ, И.Т.БИРЮКОВА**

**СОДЕРЖАНИЕ SCD40 И ПОКАЗАТЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ  
ЭНДОТЕЛИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК**

**I.I.TOPCHII, A.N.KIRIENKO, M.M.DUNAEVSKAYA,  
E.N.SCHENYAVSKAYA, I.T.BIRUKOVA**

**THE CONTENTS OF SCD40 AND INDICATORS OF DAMAGED  
ENDOTHELIUM IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE**

ГУ «Институт терапии имени Л.Т.Малой НАМН Украины»

*The State Institute of Therapy named after L.T. Maloy of NAMS of Ukraine*

**Ключевые слова:** *хроническая болезнь почек, гипертоническая болезнь, VE-кадгерин, циркулирующие клетки эндотелия, sCD40*

**Keywords:** *chronic kidney disease, hypertension, VE-cadherin, circulating endothelial cells, sCD40.*

**Резюме.** *Вступление. Нарушения структуры и функции эндотелия почечных сосудов рассматривают как один из важных факторов прогрессирования и хронизации заболеваний почек. Известно, что в процессе агрегации форменных элементов крови и их адгезии к стенке сосудов особая роль принадлежит системе клеточного иммунитета - взаимодействие CD40/CD40L оказывает влияние на характер иммунного ответа, активацию клеток белой крови. Мы исследовали, были ли изменения содержания sCD40 в сыворотке крови больных ХБП связаны с показателями целостности эндотелия у этих больных и как проводимая терапия влияла на эти показатели.*

*Материал и методы. Степень повреждения эндотелия оценивали по количеству ЦЭК и содержанию VE-кадгерина в плазме крови, уровни sCD40*

измеряли у 34 пациентов с ХГН, 38 пациентов с ХрПН, группу сравнения составили 42 больных с ГБ. Все больные получали базовую терапию с использованием ингибитора АПФ периндоприла в комбинации с антагонистом кальциевых каналов амлодипином. Вместе с базовой терапией больным внутривенно капельно вводился инъекционный раствор препарата «Кардиоаргинин».

*Результаты и обсуждение.* У больных ХБП выявлено увеличение содержания sCD40 в сыворотке крови по сравнению со здоровыми субъектами и больными ГБ. Уровни sCD40 коррелировали с количеством ЦЭЖ и содержанием VE-кадгерина в плазме крови. Применение кардиоаргинина в сочетании с базовой терапией приводило к уменьшению содержания sCD40 и стабилизации структуры эндотелия. Нарушение целостности эндотелия у больных ХБП, по-видимому, обусловлено ускоренным апоптозом его клеток с их десквамацией под воздействием активированных клеток белой крови и системы цитокинов.

*Выводы.* Увеличение содержания sCD40 у больных ХБП может быть компенсаторным механизмом, направленным на уменьшение активности воспалительного процесса путем блокирования взаимодействия CD40/CD40L на клеточном уровне.

**Summary.** *Introduction.* Impairments of endothelial structure and functions of renal vessels are regarded as important factors of progression and chronization of chronic kidney disease (CKD). It is well known that the CD40/CD40L interaction is responsible for the aggregation of blood cells and their adhesion to the vascular wall, as well as its effect on the state of immune response. We investigated whether this interaction could be altered in patients with CKD and impaired immune status.

*Materials and methods.* We examined 48 patients with chronic glomerulonephritis (CGN), 38 patients with chronic pyelonephritis and 42 patients with essential hypertension (EH) - control group. All patients received standard therapy with an ACE inhibitor perindopril in combination with a calcium channel

*antagonist amlodipine. Along with standard therapy the patients intravenously administered injections of "Kardioarginine." The degree of endothelial damage was assessed by the number of CEC and VE-cadherin content in blood plasma. In order to estimate changes in the immune status we determined the content of sCD40 in serum.*

*Results. Increase in the content of serum sCD40 was shown for the CGN patients compared with healthy subjects and EH patients. The level of sCD40 in serum correlated with the number of CEC and VE-cadherin content in plasma. The use of kardioarginine combined with standard therapy led to reduction of sCD40 and stabilized the structure of endothelium. The loss of endothelial integrity in patients with CKD is apparently due to the activation of apoptosis with subsequent accelerated desquamation under the influence of activated white blood cells and the system of cytokines.*

*Conclusions. The increase of sCD40 in patients with CKD may be a compensatory mechanism aimed to reduce the inflammatory activity by blocking the CD40/CD40L interaction at the cellular level.*

**ВВЕДЕНИЕ.** В клинике внутренних болезней наличие микроальбуминурии признается как показатель поражения сердечно-сосудистой системы [3]. Это свидетельствует о том, что при повреждении эндотелия у больных атеросклерозом и при нарушении его целостности в капиллярах клубочков у больных хронической болезнью почек (ХБП) могут принимать участие одни и те же механизмы. К признакам повреждения эндотелия относят соотношение клеток предшественников эндотелия к его апоптозным клеткам, циркулирующим в кровеносном русле (ЦЭК), а также содержание фактора von Willebrand, VE-кадгерина [10]. Предикторами повреждения сосудов считаются показатели С-реактивного белка, содержание асимметричного диметиларгинина и G-катепсина, активность ряда протеиназ [2,7]. Учитывая то, что и прогрессирующее течение ХБП, и дестабилизация атеросклеротических бляшек обусловлены нарушением целостности сосудистого эндотелия с участием макрофагов, чрезвычайно

важны сведения о механизмах взаимодействия клеток крови с клетками эндотелия. Полагают, что в патогенезе повреждения стенки сосудов при активации клеток белой крови особая роль принадлежит ряду интерлейкинов, E-селектина, адгезивных молекул ICAM (CD-54), VCAM (CD-106), CD40 и CD40L [5,9]. В последние годы особое внимание уделяется взаимодействию CD40/CD40L, которое играет важную роль в развитии и гуморального и клеточного иммунного ответа. В регуляции этого взаимодействия принимает участие растворимая форма CD40 (sCD40), которая продуцируется путем ее отделения от CD40-экспрессирующих клеток. sCD40 влияет на взаимодействие CD40/CD40L, блокируя активацию клеток белой крови и иммунный ответ в целом [5]. Вместе с тем до настоящего времени точно не установлено, имеется ли связь уровня содержания sCD40 с развитием васкулопатии у больных ХБП. В этой связи мы исследовали уровни содержания sCD40 у больных ХБП в динамике лечения.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Обследовано 72 больных хронической болезнью почек, из них 34 больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) и 38 больных хроническим пиелонефритом (ХрПН). Средний возраст пациентов с ХБП составлял (49±7) лет. Группу сравнения составили 42 больных гипертонической болезнью (ГБ) соответствующего возраста. Диагноз ХБП устанавливался согласно классификации, предложенной ДУ «Институтом нефрологии АМН Украины», принятой II национальным съездом нефрологов Украины (г. Харьков, 23-24 сентября 2005 г.), и согласованной с МКХ-10. Определение стадии ГБ и стратификацию больных по степени общего риска осложнений проводили согласно рекомендациям Украинской ассоциации кардиологов по профилактике и лечению артериальной гипертензии (2008). Пациенты с эндокринной патологией, гематологическими, инфекционными и онкологическими заболеваниями не включались в исследование. В диагностическом процессе использовали стандартные методы опроса и обследования больных с учетом жалоб, анамнеза заболевания, данных

объективного обследования, лабораторных и инструментальных методов исследования. Всем больным проведено УЗ исследование сердца и почек, рентгенографию грудной клетки.

Степень повреждения эндотелия оценивали по количеству ЦЭК. Выделение и количественный анализ ЦЭК в обогащенной тромбоцитами плазме осуществляли по методу Hladovec J. Содержание VE-кадгерина (CD-144) и концентрацию sCD40 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью тест-систем производства Bender Metlsystems (Австрия). Концентрацию альбумина в моче определяли иммуноферментным методом с использованием тест-системы «Альбумин-ИФА» (ООО НВЛ «Гранум», Украина). Все больные получали базовую гипотензивную терапию с использованием ингибитора АПФ (периндоприла в дозе 5-10 мг один раз в сутки) в комбинации с антагонистом кальциевых каналов амлодипином в дозе от 5 до 10 мг в сутки. Вместе с базовой терапией в течение 10 суток больным внутривенно капельно вводился инъекционный раствор препарата «Кардиоаргинин» в дозе 10 мл (основные действующие вещества препарата: диаргинина сукцинат, аргинина аспарагинат, калия и магния аспарагинат). Статистическую обработку проводили с помощью компьютерных программ “SPSS 13”, “Microsoft Excel 2000”.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При исследовании особенностей функционального состояния почек установлено, что у больных ХГН и ХрПН отмечается повышение концентрации креатинина в плазме крови, возрастание экскреции белка с мочой и снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ), (табл.1).

В результате обследования 10 здоровых субъектов было установлено, что в сыворотке здоровых уровни людей sCD40 составляли от 7 пг/мл до 16 пг/мл, в среднем (11,4 пг/мл). У больных ХГН до начала лечения были отмечены значительно более высокие концентрации sCD40 ( $p < 0,05$ ), чем у здоровых лиц. Статистически достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) в концентрациях

sCD40 имели место также между группами больных ХГН и ГБ (35,14±3,8) пкг/мл и (25,28±2,57) пкг/мл, соответственно.

Таблица 1

**Показатели функционального состояния почек у обследованных больных (M±m)**

Показатели	Группы больных			
	Контрольная группа (n=10)	1 группа ХГН (n=34)	2 группа ХрПН (n=38)	3 группа ГБ (n=42)
Протеинурия, г/сут.	0	0,98±0,20*	0,62±0,10*	0,03±0,01
СКФ, мл/мин.	105,8±9,8	47,3±3,5*	69,0±7,6*	84,7±3,0 <sup>#</sup>
Креатинин крови, мкмоль/л	73,9±5,8	169,7±13,1*	136,5±23,5*	92,6±4,7 <sup>#</sup>

Примечания : \* - достоверность < 0,05 по сравнению с контрольной группой  
# достоверность < 0,05 по сравнению с больными ХГН

Повышение содержания sCD40 сопровождалось увеличением количества ЦЭК и VE-кадгерина в плазме крови. В динамике лечения установлено снижение уровня суточной экскреции белка с мочой у пациентов с ХГН и ХрПН - у пациентов, получавших базовую терапию отмечено снижение протеинурии на 22% по сравнению с исходными значениями (p<0,05). Более существенные изменения показателя наблюдались у больных, которые дополнительно получали кардиоаргинин: уровень протеинурии снизился на 38,2%, по сравнению с показателями до лечения (p<0,05).

Положительные изменения функции почек сопровождалось изменениями исследуемых показателей. После завершения курса терапии у

больных ХГН и ХрПН наблюдалось достоверное снижение содержания sCD40 по сравнению с показателем до лечения ( $p < 0,05$ ), (табл. 2).

Таблица 2

**Показатели целостности эндотелия и концентрация sCD40 у  
больных ХБП и ГБ (M±m)**

Группы больных	Концентрация sCD40, (пкг/мл)		Количество ЦЕК (ед.)		Содержание VE- кадгерина (нг/мл)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Больные с ГБ (n- 42)	28,96±3,5	25,24±1,5	10,2 ± 1,9 (n=42)	5,8 ± 1,1 (n=36)	0,610 ± 0,122 (n=42)	0,343 ± 0,059* (n=40)
Больные с ГНТ (n- 34)	35,14±3,8 * *-	28,94±1,6 1*	18,5 ± 2,8* *- (n=34)	13,0 ± 1,4* (n=32)	1,112± 0,246 **-, (n=34)	0,635 ± 0,125* (n=32)
Больные с ХрПН(n- 38)	29,25±2,5 * *-	23,51±1,2	12,1 ± 2,5	8,1 ± 2,5	1,109 ± 0,195	0,435 ± 0,045*
Здоровые Лица (n- 10)	11±1,5	-	2,1±0,5	-	0,308±0, 110	

Примечания: 1.\* – достоверно в сравнении с показателями до лечения,  $p < 0,05$ .

2. \* \*- достоверно в сравнении с показателями здоровых лиц,  $p < 0,05$ .

Возникновение и прогрессирование хронических заболеваний почек, в частности хронического гломерулонефрита и хронического пиелонефрита, связаны с системным воспалением, показатели которого являются маркерами неблагоприятного прогноза и высокого риска развития хронической почечной недостаточности. Независимо от расхождения в этиологии и патогенезе хронических заболеваний почек, существенное участие в прогрессировании клеток иммунной системы и провоспалительных цитокинов не вызывает сомнения и доказано как экспериментальными, так и клиническими исследованиями. У пациентов с ХБП отмечены различные

виды нарушений иммунологического статуса, приводящие к частым бактериальным инфекциям, повышению частоты рака по сравнению с общей популяцией, ускоренному развитию атеросклероза и сердечно-сосудистых осложнений [3]. Немного известно о функциях В-клеток в уремиических пациентов и трудно определить причину этих измененных реакций, однако известно, что в клеточном иммунном ответе критическую роль играет взаимодействие CD40/ CD40L [7,8].

CD40 - мембранный гликопротеид с молекулярным весом 50 000, который принадлежит к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (ФНО). Он экспрессируется на В-лимфоцитах, эндотелиальных клетках, эпителиоцитах (особенно эпителиальных клетках почечных канальцев), моноцитах/макрофагах, дендритных клетках и фибробластах. Лиганд для CD40, CD40L (CD154, gp39) - гликопротеид с молекулярным весом 33 000 также является членом суперсемейства ФНО. Он быстро экспрессируется на поверхности активированных Т-лимфоцитов, принадлежащих преимущественно к субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [4,9]. Базофилы, тучные клетки, эозинофилы, НК-клетки и тромбоциты также экспрессируют CD40L. Триггерный механизм соединения CD40/CD40L является наиболее мощным сигналом для активации В-клеток, этот сигнал даже более эффективен, чем сигналы, опосредуемые поверхностными иммуноглобулинами [5]. Эта связь необходима для активации антигенпредставляющих клеток, поскольку индуцирует стимулирующие молекулы и синтез цитокинов. Сигналы, следующие из взаимодействия CD40/CD40L, являются реверсивными, поскольку стимуляция CD40L индуцирует кратковременную активацию и продукцию цитокинов на Т-лимфоцитах. Еще в 1994 году van Kooten С. и соавт. показали, что естественным антагонистом взаимодействия CD40/CD40L является растворимая форма CD40 (sCD40), которая ингибирует связывание CD40L с CD40 [5].

Изменения, лежащие в основе нарушения межклеточного взаимодействия, отслоения эндотелиальных клеток и появления протеинурии изучены недостаточно. Известно, что наряду с артериальной гипертензией, оксидантный стресс и длительное увеличение содержания провоспалительных цитокинов играет патогенетическую роль в развитии васкулопатий [7]. По нашим данным в начальной стадии повреждения эндотелия важную роль играет активность клеток белой крови - для хронического гломерулонефрита характерна более выраженная активация моноцитарного звена, а уровень провоспалительных цитокинов в крови больных выше, чем при хроническом пиелонефрите. Было установлено, что при ХБП как при хроническом пиелонефрите, так и при хроническом гломерулонефрите отмечается значительное повышение числа CD16<sup>+</sup> клеток и изменяется фенотип популяции моноцитов [1]. Повышение количества CD16<sup>+</sup> моноцитов при заболевании почек приводит к повышению уровней ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 в плазме крови, увеличению экспрессии межклеточных молекул адгезии и их рецепторов. Так, в контрольной группе уровень ИЛ-1 $\beta$  в плазме составлял (29,8 $\pm$ 8,4) пг/мл, а у больных хроническим пиелонефритом (79,4 $\pm$ 19,2) пг/мл (P<0,05). Аналогичные изменения мы наблюдали и при исследовании ИЛ-6. Отмечалось почти 3-кратное повышение уровня этого цитокина в плазме крови больных в сравнении с контролем - (44,3 $\pm$ 14,6) пг/мл и (19,8 $\pm$ 6,9) пг/мл соответственно. Существенные изменения концентрации провоспалительных цитокинов были обнаружены и при обследовании больных ХГН. Так уровень ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 в плазме крови больных составлял (94,6 $\pm$ 26,9) пг/мл и (65,8 $\pm$ 23,7) пг/мл соответственно, что существенно превышает показатели контрольной группы. Повышение синтеза цитокинов в моноцитах (известных факторов денудации эндотелия) сопровождалось повышением содержания ЦЭК и VE-кадгерина, а также увеличением в плазме крови sCD40 – блокатора образования активирующего межклеточного звена CD40/CD40L. Увеличение у больных уровня VE-кадгерина, признанного маркера отслоения эндотелия, вместе с

увеличением ЦЭЖ и количества цитокинов могут косвенно свидетельствовать об усилении апоптоза сосудистого эндотелия и повышении проницаемости капилляров клубочков в этой группе больных.

Наши данные согласуются с результатами других авторов, которые исследовали *in vivo* наличие растворимого CD40 и его возможные изменения у пациентов на гемодиализе и у больных с ХБП в додиализном периоде. Было показано, что по сравнению с низким уровнем sCD40 в сыворотке крови здоровых доноров, уровни sCD40 были значительно увеличены в сыворотках пациентов с уреимией [3,6]. Среди них самый высокий уровень sCD40 был обнаружен у больных находящихся на лечении методом гемодиализа. По мнению авторов, факторы, связанные с гемодиализом модулировали уровни sCD40 в сыворотке значительно больше, чем уровень креатинина, так как уровни sCD40 у пациентов с уреимией до гемодиализа значительно ниже уровня sCD40 у больных с гемодиализом, невзирая на высокие уровни креатинина сыворотки крови. По-видимому, более значительно на уровень sCD40 играет воспаление, о чем свидетельствует связь sCD40 и СРБ у пациентов всех групп.

Коррекция содержания sCD40 представляет определенные трудности и в эксперименте и в клинике – в то время как его содержание не уменьшается в процессе гемодиализа, пересадка почек приводила к быстрому уменьшению уровня sCD40 [3,5]. Установлено нами благоприятное влияние лечения на снижение содержимого sCD40 и показатели повреждения эндотелия связано, по-видимому, с улучшением и структуры и функции эндотелия. Такие изменения могут быть обусловлены положительным влиянием лечения на функционально-морфологические свойства моноцитов, т.к. ранее нами было показано, что использование комплексной терапии с применением кардиоаргинаина приводило к снижению количества CD16+моноцитов на 33,1% по сравнению с показателями до лечения [1].

## **ВЫВОДЫ:**

1. Нарушение целостности эндотелия у больных ХБП обусловлено усиленным апоптозом клеток эндотелия с их десквамацией под воздействием активированных клеток белой крови и системы цитокинов.
2. Увеличение содержания sCD40 у больных ХБП может быть компенсаторным механизмом, направленным на уменьшение активности воспалительного процесса путем блокирования взаимодействия CD40/CD40L на клеточном уровне.

### **ЛИТЕРАТУРА:**

1. Уровень и фенотипические особенности липиднагруженных лейкоцитов у больных хроническим гломерулонефритом в сочетании с ишемической болезнью сердца / Гальчинская В.Ю., Топчий И.И., Семеновых П.С. [и др.] // Научные ведомости БЕЛГУ. – 2012. - №10. – В.18. – с. 46.
2. Топчий И.И. Взаимосвязь содержания асимметричного диметиларгинина с нарушением регенерации клеток эндотелия и уменьшением биодоступности оксида азота у больных хронической болезнью почек в сочетании с атеросклерозом / Топчий И.И. // Семейна медицина. – 2011. – №4. – С. 81-88.
3. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. // Lancet. – 2010. – V. 375. – P. 2073-2081.
4. Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/ reperfusion injury in mice / David A., Ferenbach B., Sheldrake A.Tara [et al.] // Kidney International. – 2012. – V. 2. – P. 928-933.
5. B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40 / Van Kooten C., Gaillard C., Galizzi J.P. [et al.] // Eur J Immunol. – 1994. – V. 24. – P. 787–792.

6. Lee S. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair / Lee S., Huen S., Nishio H. // J Am Soc Nephrol.-2011.-Vol.22.-P.317-326.
7. Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury. / Li B., Cohen A., Hudson T.E. [et al.] // Circulation. – 2010. – Vol. 121(20). – P. 2211-2220.
8. Serum Level of sCD40 Ligand and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in cases of Acute Ischemic Coronary and Cerebral Events / Naglaa M. El Khayat, Ahmed Khashaba, Samar Refaat, Mervat El-Fiky // Egypt J Neurol Psychiat Neurosurg. – 2010. – Vol. 47(4). – P. 665-672.
9. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity / Quezada S.A., Jarvinen L.Z., Lind E.F., Noelle R.J. // Annu Rev Immunol. – 2004. –Vol. 22. – P. 307-328.
10. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player / Vestweber D., Winderlich M., Cagna G., Nottebaum A.F. // Trends Cell Biol. – 2008. – Vol. 19(1). – P. 8-15.

Топчій Іван Іванович

[itopchiy@yandex.ua](mailto:itopchiy@yandex.ua)

*Надійшла до редакції 26.04.2013*

*Прийнята до друку 8.05.2013*