УДК 616.61-002.3:615.37

ВПЛИВ НУКЛЕЇНАТУ НА ПОКАЗНИКИ ІМУНІТЕТУ І ЛІЗОСОМАЛЬНОЇ ЕНЗИМУРІЇ У ХВОРИХ НА ПІЄЛОНЕФРИТ

ДРІЯНСЬКА В.Є., СТЕПАНОВА Н.М., ГАЙСЕНЮК Ф.З., РУДЕНКО М.Ю., КОРОЛЬ Л.В., ЛАВРЕНЧУК О.В., БУСИГІНА Ю.С., МАЛАШЕВСЬКА Н.М., МІГАЛЬ Л. Я., БІЛОГЛАЗОВ В.О., ГОРДІЄНКО А.І., ДРАННІК Г.М.

ДУ «Інститут нефрології НАМН України»; Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського

Протягом останнього десятиріччя відновлюється інтерес медичної науки до проблеми імуногенезу інфекцій сечової системи і ефективності лікування пієлонефриту (ПН). В першому напрямку досліджень сучасним є визначення ролі цитокінової ланки, до якої відносяться прозапальні TNF- , IL-1, IL-18, MCP-1, які синтезуються моноцитами/макрофагами, лімфоцитами та ін. у вогнищі запалення, забезпечують регуляцію основних етапів гострого та хронічного запалення у нирці, накопичення екстрацелюлярного матриксу, що є причиною розвитку тубулоінтерстиціального фіброзу [9, 12, 15].

Викликає інтерес роль нещодавно відкритих IL-17 та IL-23. Відомо, що під впливом IL-16 і IL-1 наївні CD4+ Т-лімфоцити починають перетворюватись в клітини попередники Т-хелперів 17, в подальшому під впливом IL-23 вони дозрівають в Т-х 17, що секретують IL-17 і інші прозапальні цитокіни - TNF- , MCP-1, а також IL-23, вивчення якого при пієлонефритах є переспективним [11]. Важливу роль IL-17 відіграють в рекрутуванні, активації і міграції нейтрофілів, захисті організму від грам-негативних бактерій, деяких видів грибів [10].

Останні роки з’ясовується роль NGAL (Neutrophil gelatinase-asscociated lipocalin) - ліпокаліну, асоційованого з желатиназою нейтрофілів, який продукується імунокомпетентними клітинами, гепатоцитами, клітинами ниркових канальців тощо, при ішемічному або нефротоксичному стресі і також може приймати участь в захисті від бактеріальних інфекцій за рахунок зв’язування з мікробними сидерофорами [2].

На інвазію мікроорганізмів організм реагує запальною реакцією, важливою частиною якої є поліморфноядерні гранулоцити. Їх активність регулюється секреторними інгібіторами лейкоцитарних протеїназ – secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI), протеїнами, які експресуються на слизових та захищають від небажаного впливу тканини хазяїна. SLPI є ендогенними антимікробними пептидами – важливими складовими захисної системи, які викликають лізис мікроорганізмів і ефективні проти широкого спектру бактерій, грибів і вірусів [13, 16].

Основою лікування пацієнтів з гострим та хронічним пієлонефритом (ПН) є використання антибактеріальних лікарських засобів, які не завжди ефективні, що зв’язано, насамперед, з розвитком резистентності етіопатогенів або наявністю L-форм бактерій [14]. Негативним результатом лікування антибіотиками можна також вважати їх токсичність та вплив на стан паренхіми нирок, дисбактеріоз, що диктує необхідність пошуку нових додаткових терапевтичних засобів.

Розробка та удосконалення сучасних принципів корекції порушень імунітету є складною проблемою клінічної імунології. Проблема застосування імунотропної терапії ставить ряд питань: вивчення глибоких механізмів дії препаратів; розробка чітких критеріїв для застосування імунокоректорів; визначення протипоказань; встановлення клініко-імунологічних тестів оцінки ефекту впливу препаратів; визначення оптимальної тактики лікування імуномодуляторами - дози та способи введення, сполучення з іншими препаратами, ускладнення.

Клінічні імунологи мають позитивний досвід використання імуномодуляторів, які можуть покращити результати лікування хворих та знизити частоту рецидивів, хоча даних щодо механізмів їх позитивної дії, в тому числі на продукцію цитокінів, недостатньо.

Земсков А. та співавт. ще в 1994 р. при лікуванні хронічного пієлонефриту призначали нуклеїнат натрію [4], який прискорював процеси регенерації, стимулював діяльність кісткового мозку, викликаючи лейкоцитарну реакцію і лімфопоез, стимулював міграцію і кооперацію Т- і В-лімфоцитів, підвищував фагоцитарну реакцію, потенціював діяльність антибактеріальних препаратів, але складні імунні механізми не вивчались. Натрію нуклеїнат – це продукт гідролізу дріжджів. Особливістю препарату є його здатність стимулювати лейкопоез та антиінфекційну резистентність організму за рахунок активації енергетичного обміну в клітинах макрофагальної системи. Вітчизняний препарат Нуклеїнат є хемоатратракантом для лейкоцитів та лімфоцитів, посилює їх міграцію з одночасним підви-

щенням вмісту АТФ, АДФ, АМФ, МАО. Дія на Т і В- лімфоцити опосередкована через активацію макрофагів, що відображається у підвищенні титру антитіл та покращенні кооперації клітин імунної відповіді. Препарат посилює міграцію з кісткового мозку стовбурових клітин, збільшує утворення клітин імунологічної пам’яті. У людей з набутими імунодефіцитами різного походження Нуклеїнат нормалізує знижену кількість Т- та В-клітин, їх функціональну активність, суттєво стимулює знижені Т-хелпери та Т-супресори, нормалізує дисбаланс популяцій лімфоцитів, нормалізує вміст антигенреактивних клітин і сироваткових імуноглобулінів класів G, A, M. Крім того, препарат захищає від імунодепресивної дії антибактеріальних препаратів, які призначаються при запальних процесах [5, 6].

Метою роботи було визначення ефектів Нуклеїнату у хворих на пієлонефрит за даними динаміки імунологічних та біохімічних показників, що асоціюють з процесом запалення (цитокіни, SLPI, загальний і анти-ET sIgA) та станом функціональної активності нирок (NGAL, реноспецифічні ензими).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Імунологічні та біохімічні обстеження проведені у 51 хворого на пієлонефрит в динаміці лікування. Поряд з традиційною антибактеріальною терапією, 31 пацієнт отримував Нуклеїнат (4 рази на добу в дозі 0,25 г протягом 14 днів) – 21 хворий на хронічний пієлонефрит (ХПН) (2 гр) і 10 – на гострий (ГПН) (3 гр). Групу порівняння склали 20 хворих, які отримували тільки антибактеріальну терапію (1 гр). Пацієнти були обстежені до та після закінчення курсу лікування.

Тестування TNF-α, MCP-1, IL-1, -4, -17, -18, -23 проводилось за допомогою імуноферментного методу на приладі «SunRise TouchScreen»; використовували тест-системи «Diaclone» (Франція), DRG (США), «Bender Medsystems» (США), ООО «УкрмедДон» (Донецьк, Україна), Вектор Бест (РФ). Аналогічно визначенню цитокінів за допомогою ІФА (STAT-Fax 303 Plus) та тест-системи «Hycult biotechnology» Human SLPI (Нідерланди) вивчали рівень SLPI в сироватці крові (розведення 1:10) і сечі; для визначення анти-ET-sIgA та загального sIgA у слині – тест системи, впроваджені лабораторією імунології Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського. Межі нормальних значень (референтний діапазон) були отримані на основі результатів дослідження 20 умовно здорових осіб.

Для оцінки функціонального стану паренхіми нирок використовували визначення активності ферментів лізосомного походження – загальної НАГ та β-Гал, що визначали у разовій порції ранкової сечі за методом О.О. Покровського у нашій модифікації [3].

Отримані дані оброблені статистично на персональному комп’ютері за допомогою пакета програм “SPSS for Windows. Версія 11” та “MedStat”. Для статистичної обробки використовувались параметричні критерії статистики - тест Ст’юдента або непараметричний – критерій УІЛкоксона; достовірною вважали різницю при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

Аналіз показав підвищення досліджених показників у хворих на пієлонефрит, MCP-1 та SLPI були найбільш високими в 3 гр (відповідно, $p<0,001$ і $< 0,05$), а IL-4 - в 2 гр. ($p=0,027$).

Антибактеріальна терапія не призводила до достовірних змін цитокінів ($p>0,05$), за винятком IL-1 - від 60 [45; 75] до 21 [14,5; 25,3] пкг/мл ($p=0,001$).

Використання Нуклеїнату (2 гр) в комплексній терапії сприяло достовірному зниженню рівнів прозапальних цитокінів, хоча і не досягала значення показників в нормі, різниця з якою зберігалась для всіх показників ($p<0,001$), за винятком IL-18 (який і до лікування був нормальним), що оцінюємо як позитивні наслідки дії цього препарату (рис. 1). Не виявлено динаміки IL-17 ($p=0,316$) (рис. 1), тобто на функціональну активність Т-хелперів (Т-х) 17 Нуклеїнат не впливав.

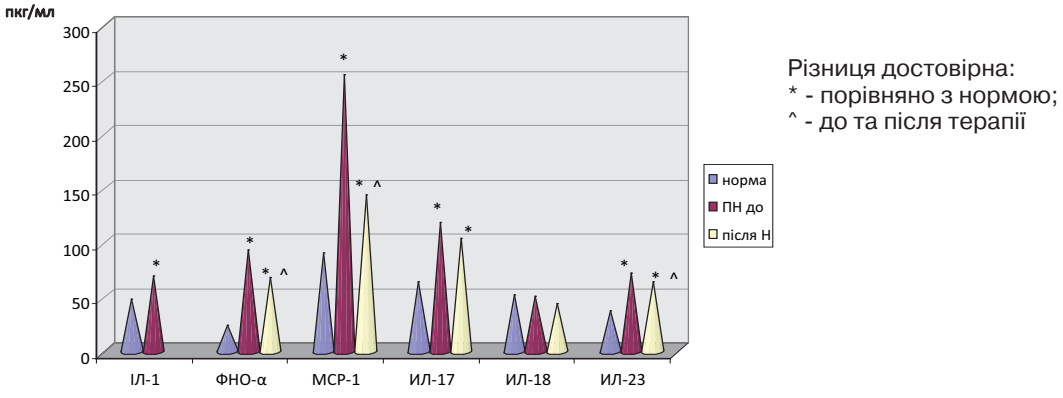


Рис. 1. Середні рівні прозапальних цитокінів крові у здорових донорів та хворих на ПН до та після лікування в 2 гр. з використанням Нуклеїнату (Н).

Привертає увагу достовірне зниження після Нуклеїнату рівню IL-18, відомого як γ-IFN-індукуючий фактор [14], хоча середні показники і залишаються у межах норми. В цьому аспекті треба обережно підходити до використання Нуклеїнату у хворих на ПН на фоні хронічної рецидивуючої герпесвірусної інфекції, тому що, за нашими даними, концентрація γ-IFN в сироватці крові у таких пацієнтів достовірно нижче, ніж у хворих з нормальними титрами АТ до HSV і CMV.

Після застосування Нуклеїнату відбувалось достовірне зниження протизапального, але стимулюючого продукцію деяких Ig, IL-4 від 65,8±6,2 до 43,8±4,0 (p=0,004).

В досліджуваній групі достовірно зменшився середній показник загального sIgA слини від 338,5±42,0 до 191,5±16,8 мг/л (p=0,026) і не відрізнявся від норми - 166,2±26,1 (p=0,166), тоді як показник анти-ET-sIgA не змінювався – 0,327±0,04 та 0,237±0,04 ум. од. опт. густ (p=0,169). В групі порівняння достовірних змін цих показників не відбувалося (p=0,483 і p=0,853).

NGAL, підвищення якого корелює з раннім порушенням функції нирок, достовірно знижувався після застосування Нуклеїнату (p=0,030) до нормального рівня (p=0,746) у хворих на ГПН; у хворих на ХПН при тенденції до зниження (p=0,072) після лікування цей показник також не відрізнявся від здорових (p=0,588) (рис. 2). В той же час, використання стандартної схеми лікування не змінювало цей показник (p=0,480), який і після терапії перевищував норму (p=0,006) (рис. 2).

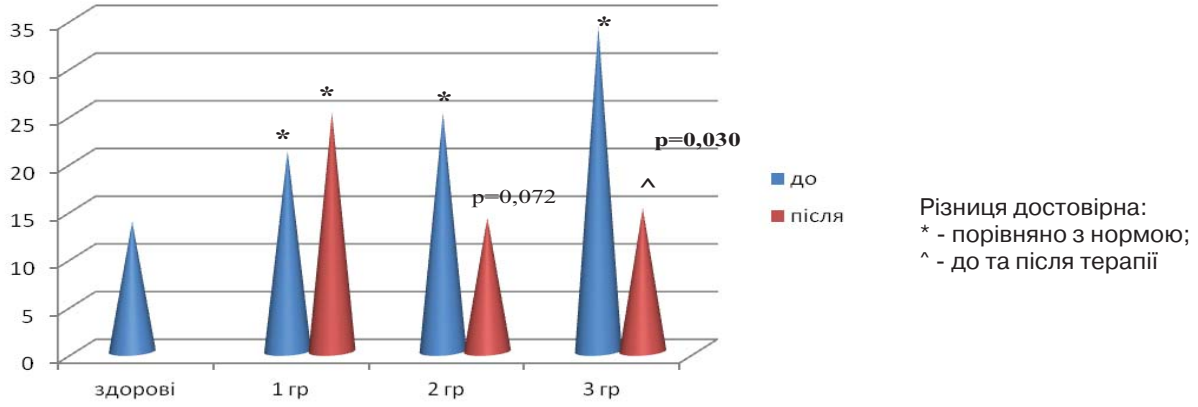
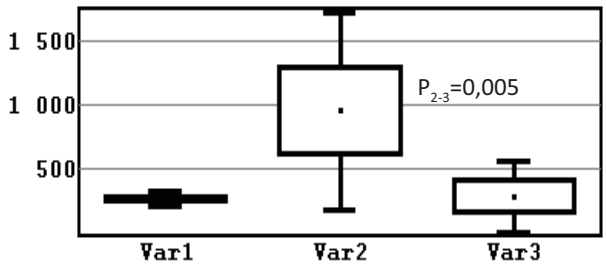


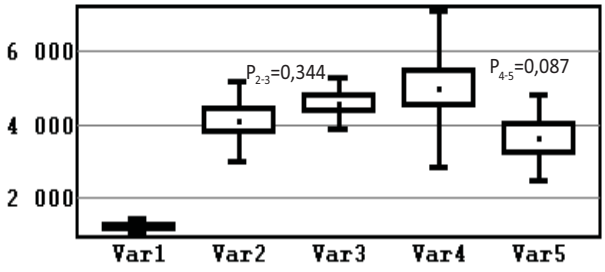
Рис. 2. Рівень НГАЛ в сироватці крові хворих на ХПН (2 гр) та ГПН (3 гр), які лікувалися за стандартною схемою (1 гр) та з використанням Нуклеїнату.

Дослідження SLPI, підвищених в крові і сечі у хворих на ПН (як гострий, так і хронічний), показали, на відміну від групи порівняння, достовірне зниження після використання Нуклеїнату цих показників в сечі до норми (рис. 3). Зміни в крові, так само як і в 1 гр., були недостовірними для ХПН, тоді як при ГПН виявлена тенденція до зниження рівня SLPI в крові (p=0,087) (рис. 4).



$P_{2-1} \leq 0,05$; $P_{3-1} = 0,148$

Рис. 3. Рівень SLPI в сечі у здорових (1), у хворих на ПН до та після лікування з використанням Нуклеїнату.



$P_{2,3,4-1} \leq 0,001$; $P_{5-1} = 0,005$

Рис. 4. Рівень SLPI в крові у здорових (1), у хворих до та після лікування з використанням Нуклеїнату в 2 гр (2, 3) та 3 гр (4, 5).

Було оцінено ефективність лікувальних заходів за даними ензимологічних показників, що характеризують ступінь включення паренхіми нирок до патологічного процесу. Рисунок 5 демонструє зміни лізосомальної ензимурії за даними активності НАГ сечі в динаміці лікування хворих на пієлонефрит Нуклеїнатом.

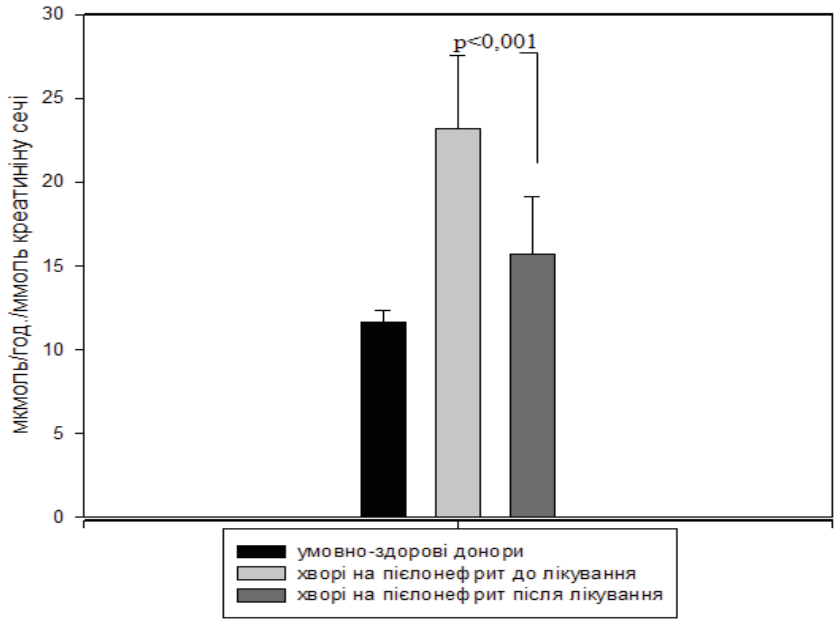


Рис. 5. Динаміка активності N-ацетил-β-Д-глюкозамінідази під впливом лікування Нуклеїнатом.

Як видно з наведених даних, активність НАГ сечі у обстежених жінок до початку лікування перевищувала аналогічний показник у групі контролю (p<0,001). Після комплексного лікування із застосуванням Нуклеїнату активність НАГ достовірно знизилась (p<0,001). Спрямованість змін активності в-Гал сечі аналогічна, хоча і менш виражена (рис. 6).

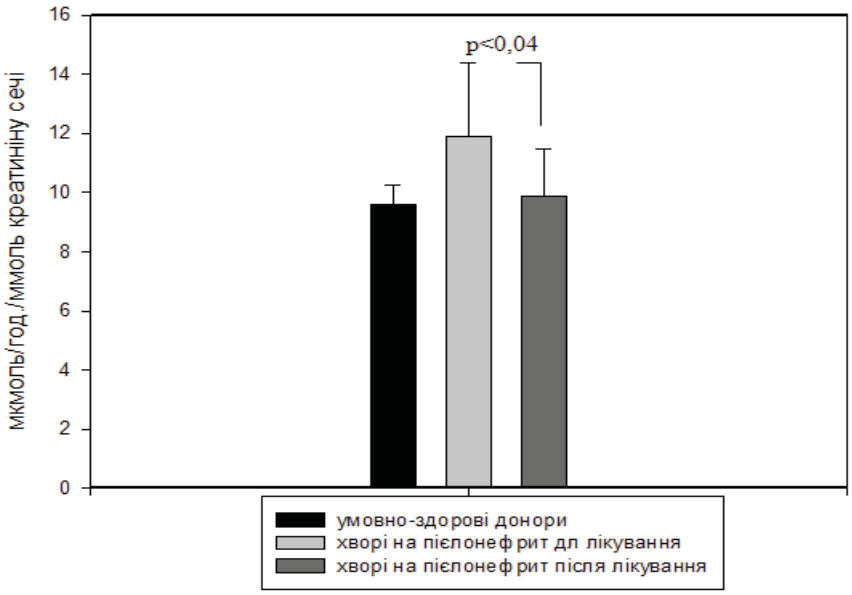


Рис. 6. Динаміка активності β-галактозидази під впливом лікування Нуклеїнатом.

Індивідуальний аналіз ефективності лікування препаратом Нуклеїнат показав, що рівні активності як НАГ, так і β-Гал нормалізувалися у 83%, залишилися без змін у 17% хворих, що свідчить про позитивний вплив цього препарату на активність умовно реноспецифічних ензимів. Підкреслимо, що у більшій мірі це стосується рівнів активності β-Гал сечі, показники якої у відповідь на традиційне антибактеріальне лікування позитивно реагували лише у 25% випадків.

Таким чином, підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що у хворих на пієлонефрит використання Нуклеїнату позитивно впливає на моноцитарно-макрофагальну

ланку імунітету з достовірним зниженням TNF-α, MCP-1, IL-18 і IL-23, що приводить до зменшення активності запалення та, відповідно, активності Th2 за продукцією протизапального IL-4. Важливим ефектом використання цього препарату є також зниження до норми маркеру ураження нирок NGAL в крові і рівнів SLPI, НАГ та в-Гал в сечі як при гострому, так і хронічному ПН з тенденцією зниження показників SLPI в крові у хворих на ГПН.

Отримані результати свідчать про позитивний вплив препарату Нуклеїнат на функціональний стан канальцевого нефротелію. Вважаємо доцільним рекомендувати використання Нуклеїнату у хворих з загостренням ХПН та ГПН в стадії завершення запального процесу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Андріюк Л. В.* Від нуклеїнових кислот до препарату Нуклеїнат / Л. В. Андріюк // Новости медицины и фармации. – 2007. – 14 (220). – С. 16-20.
2. *Вельхов В. В.* NGAL (Липокалин-2) – «ренальный тропонин», ранний маркер острого повреждения почек : значение для нефрологии и кардиохирургии / В. В. Вельхов // Лаб. диагностика. – 2012. - № 1 (59) . – С. 42-57.
3. Діагностичне значення лізосомальної ферментурії у дітей з інфекцією сечової системи /уклад. І. В. Багдасарова, Л. Я. Мигаль, С. П. Фоміна, О. В. Лавренчук, Л. В. Король, О. О. Дащенко., Міністерство охорони здоров`я України,Академія медичних наук України, Український центр науково-медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи , Методичні рекомендації.- К.:[б. в.], 2009. - 20с.
4. *Земсков А. М.* Коррекция нуклеинатом натрия вторичной иммунологической недостаточности у больных с хроническими заболеваниями внутренних органов / А. М. Земсков, В. М. Провоторов, В. М. Земсков. – Воронеж: Радуга, 1984. – 24 с.
5. *Прохорова М. П.* Ефективність препарату Нуклеїнат при лікуванні алергічних захворювань у дітей / М. П. Прохорова, Н. Г. Бичкова // Імунологія та алергологія: наука і практика. – 2009. - № 1. – С. 104-105.
6. *Пудилова Э. В.* Влияние нуклеината натрия на функциональные и иммунофенотипические особенности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров / Э. В Пудилова, М. Б. Бродовский // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 7. – С. 52-52.
7. *Семидоцкая Ж. Д.* Опыт применения нуклеината в лечении часто и длительно болеющих пациентов / Ж. Д. Семидоцкая, И. А. Чернякова, Т. В. Бездетко // Новости медицины и фармации. — 2007. — № 16 (222). – С. 11-14.
8. *Фролов В. М.* Влияние Нуклеината на состояние макрофагальной фагоцитирующей системы у больных с синдромом повышенной утомляемости / В. М. Фролов, И. В. Лоскутова, Н. А. Пересадин // Імунологія та алергологія : наука і практика. – 2009. – № 1. – С. 76-80.
9. *Deshmane Satish L.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) : An Overview. J. / Satish L. Deshmane, Sergey Kremlev, Shohreh Amini, Bassel E. Sawaya1 // J. of interferon & cytokine research. - 2009. - Vol. 29. - № 6. - P. 3313-326.
10. *Harrington L. E.* Interleukin 17 – producing CD4+ effector T-cells develop via a lineage distinct from the T-helper 1 & 2 lineages / L.E. Harrington, R. D. Yatton, P. R. Mangan Stassen // Nat. Immunol. – 2005. – 6. – P. 1123-1132.
11. *Herberth G.* IL-17E but not IL-17A is associated with allergic sensitiation: results the LISA study / G. Herberth, C. Daegelmann, S. Roder [et al.] // Pediatr. Allergy. Immunol. – 2010. – 21. – P. 1086-1090.
12. *Heymann F.* Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis / F. Heymann, C. Trautwein, F. Tacke // Inflamm Allergy Drug Targets. - 2009. - Sep. 8 (4). - P. 307-18.
13. *Jin F.* Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor / F. A. Jin [et al.] // Infrect. Immunol. – 2005. - 66. – P. 2447-2452.
14. *Lane David R.* Диагностика и лечение инфекций мочевыводящих путей и пиелонефрита / David R. Lane [et al.] // Здоровье мужчины. – 2013. - № 1 (44). – С. 68-74.
15. *Sugama S., Conti B.* Interleukin-18 and stress / S. Sugama, B. Conti // Brain research reviews. – 2008. - 58 (1). – P. 85–95.
16. *Williams S. E.* SLPI and elafin: one glove, many fingers / S. E. Williams [et al.] // Clinical Science. – 2006. – 110. – P. 21-35.

РЕЗЮМЕ

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕИНАТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА И ЛИЗОСОМАЛЬНОЙ ЭНЗИМУРИИ У БОЛЬНЫХ ПИЕЛОНЕФРИТОМ

Дриянская В.Е., Степанова Н.М., Гайсенюк Ф.З., Руденко М.Ю., Король Л.В., Лавренчук О.В., Бусыгина Ю.С., Малашевская Н.М., Мигаль Л.Ф., Белоглазов В.А., Гордиенко А.И., Дранник Г.Н.

ГУ «Інститут нефрологии НАМН Украины»; Крымский г осударственный медицинский университета им. С.И. Георгиевского

Цитокины и SLPI играют важную роль в развитии воспаления, поэтому их исследование может определить значение в иммуногенезе пиелонефрита и как дополнительных маркеров для анализа эффективности лечения.

У пациентов с ОПН/обострением ХПН показаны особенности цитокинов как составляющих его иммуногенеза. Сочетание антибактериальной терапии с Нуклеинатом приводит к снижению уровня провоспалительных цитокинов и NGAL в крови, уровня общего sIgA в слюне; а также в моче - SLPI и реноспецифических энзимов (N-ацетил-β-Д-глюкозаминидазы и β- галактозидазы).

Иммунологические и биохимические эффекты Нуклеината свидетельствуют о целесообразности их использования в комплексной терапии с целью модуляции цитокинового звена иммунитета для повышения эфективности лечения больных пиелонефритом.

Ключевые слова: пиелонефрит, Нуклеинат, провоспалительные цитокины, секреторные ингибиторы лейкопротеаз, реноспецифические энзимы.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF NUCLEINAT ON IMMUNITY INDICATORS AND LYSOSOMAL ENZYMURIA IN PATIENTS WITH PYELONEPHRITIS

Driyanska V.Ye., Stepanova N.M., Gaysenuk F.Z., Rudenko M.Yu., Korol L.V., Lavrenchuk O.V., BusyginaYu.S., Malashevska N.M., Mygal L.A., Biloglasov V.A., Gordienko A.I., Drannik G.N.

Cytokines, SLPI, NGAL are of important value in development of inflammation, therefore the research of these indices can define their value in immunogenesis of pyelonephritis and as the additional markers for analysis the efficiency of treatment.

The peculiarities of cytokines as compounds of immunogenesis are shown in the patients having acute (A) and chronic (Ch) pyelonephritis (PN). The combination of antibacterial therapy with Nucleinat leads to decrease in blood the levels of proinflammation cytokines, NGAL, in saliva - the general sIgA; and in urine – SLPI, renal specific enzymes (N-acetyl-β-D-glucousaminidase and β-galactosidase).

Immunological and biochemical effects Nucleinat testify to the expediency of this usage in complex therapy with the aim to modulate the cytokine link of immunity for improvement of the effective treatment in patients with pyelonephritis.

Key words: pyelonephritis, Nucleinat, proinflammatory cytokines, SLPI, renal specific enzymes.

УДК 616.248-07-477.75+575.24

С159Т ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА CD14 У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ С АТОПИЧЕСКИМ И НЕАТОПИЧЕСКИМ ФЕНОТИПОМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ПОПУЛЯЦИИ КРЫМА

БИСЮК Ю. А., БЕЛОГЛАЗОВ В. А., ДУБОВОЙ А. И., ЗНАМЕНСКАЯ Л. К.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского, г. Симферополь.

По данным кросс-секционного исследования [1] в более чем 70 странах, распространённость астмы, которая была диагностирована врачом, составляет 4,3%, с наибольшей частотой в Австралии – 21%; в Украине этот показатель составляет 2,77%.

В последние годы астму рассматривают не как единое заболевание, а как большое количество клинических, иммунологических и генетических вариантов проявления воспалительных заболеваний дыхательных путей, исторически объединённых определением «бронхиальная астма» [2]. Эти варианты в литературе обозначаются как фенотипы, эндотипы или субтипы бронхиальной астмы. Фенотипы в основном обозначают клинические варианты бронхиальной астмы, а эндотипы отображают патофизиологические особенности различных фенотипов [3].

В обзоре Stephen T. Holgate [4], опубликованном в журнале “Nature Medicine”, актуализируются вопросы, которые пока остаются без ответа, например, вопрос о том, как генетические факторы предрасполагают к развитию атопии