

Materials and methods. Observations were carried out in 100 men (27 – healthy controls and 73 – with infertility). Methods: the numbers of lymphocyte populations and subpopulations CD3+, CD4+, CD8+, CD16/56+, CD19+, CD4+CD25-, CD4+CD25+ and activating markers CD3-HLA-DR+, CD3+HLA-DR+ in peripheral blood were evaluated with using immunophenotyping. The cytokines IL-1 β , 6, 10, 18; TNF- α , IFN- γ and TGF- β 1 contents in serum were determined using ELISA method.

We have found statistically significant differences between control group and groups of infertile patients with systemic autoimmune diseases and idiopathic infertility in numbers of lymphocytes and concentrations of

pro- and anti-inflammatory cytokines. It has been found that in these groups of patients may lead to dysregulation of T-dependent adaptive immunity and changes in cytokine production, and the latter may consequently lead to autoantibodies production. Some possible pathological mechanisms of the development of autoimmunity are linked either to autoaggression formation resulting in infertility. Based on our findings, we postulate the diagnostic algorithm of prognosis of immunology dependent infertility for patients with different pathology.

Key words. Populations of blood lymphocytes. Subpopulations of blood T-lymphocytes. Blood cytokines. Inflammation. Autoimmunity. Male infertility.

УДК 616.61–002.2–078.73

ПРОЗАПАЛЬНІ ЦИТОКІНИ (ІЛ-1 β , ФНП- α) ТА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС КРОВІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ХВОРОБУ НИРОК V Д СТАДІЇ З РІЗНИМ СТАНОМ КОМОРБІДНОСТІ

ДРІЯНСЬКА В.Є., КОРОЛЬ Л. В., ДУДАР І.О., МИГАЛЬ Л. Я., ГОНЧАР Ю.І., ШІФРІС І.М., МАЛАШЕВСЬКА Н.М.

ДУ “Інститут нефрології НАМН України”, м. Київ

Значною соціально-економічною проблемою в усьому світі є стабільне (до 7 % щорічно) збільшення кількості хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН), що лікуються методами замісної ниркової терапії (ЗНТ). Протягом останніх років привертає увагу проблема системного хронічного запалення (СХЗ) у хворих на ХХН V стадії (ст.), що лікуються програмним гемодіалізом (ПГД) – ХХН VД ст. Процес СХЗ формує декілька феноменів: первинна та вторинна системна альтерація, системна запальна реакція, дистрес-реакція нейроендокринної системи, органна дисфункція, аутогенна інтоксикація, а також зміни стану буферних систем антизапальної резистентності та функціональних резервів органних систем [3].

Вважається, що у пацієнтів на ПГД СХЗ є наслідком складних метаболічних та імунологічних зрушень за рахунок розвитку уремії, декомпенсації багатьох захисних систем організму та факторів, що безпосередньо пов'язані з процедурою діалізу. Процеси хронічного запалення у хворих на гемодіалізі сприяють розвитку прискореного атеросклерозу, нестабільності гемодинаміки, розвитку кардіоваскулярних ускладнень, інфекційної уразливості, розладам з боку судинного доступу, нутриційного статусу, погіршенню якості життя і виживання. Генералізоване збільшення запального процесу у пацієнтів з падінням ниркових функцій може бути пов'язано з наступними механізмами: падінням кліренсу прозапальних цитокінів, перевантаженням об'ємом, ендотоксемією, оксидативним та карбонільним стресом, падінням рівня антиоксидантів, підвищенням числа коморбідних станів [5, 13].

Відомо, що цитокіни є поліпептидними продуктами активованих клітин імунної системи і функціонують як медіатори міжклітинних комунікацій, а при імунній відповіді на місцевому та загальному рівні вони відповідають за всі послідовні етапи розвитку адекватної відповіді на патогени, запалення, відновлення ушкодженої структури тканин, розвиток атеросклеротичних уражень. В цьому аспекті велику увагу привертають цитокіни, особливо прозапальні, які переважно продукується моноцитами/макрофагами - ІЛ-1 та ФНП- α .

Показано, що порушення оксидантно/антиоксидантного (О/А) балансу в бік надлишкового утворення цитотоксичних ліпідних пероксидів з розвитком оксидативного стресу корелює з тяжкістю перебігу хронічної ниркової недостатності (ХНН) [5, 8, 15]. Стан ХНН розглядають як прооксидантний стан, при якому продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) перешкоджають реалізації біологічних функцій різних білків, зокрема знижують активність ферментів, прискорюють розвиток атеросклерозу та підвищують ризик розвитку серцево-судинних ускладнень [11, 16]. Окислення як важливий для життєдіяльності організму процес стає могутнім ушкоджуючим фактором для ліпідів та білків тільки за умови надлишкового утворення вільнорадикальних сполук та (або) за умов порушення антиоксидантного захисту (АОЗ). У той же час відомо, що у хворих з уремією АОЗ є зниженим, що обумовлено процедурою ПГД, приєднанням кардіо-васкулярних ускладнень, інших супутніх захворювань тощо [3, 4, 15].

Оцінку прогнозу перебігу хвороби у пацієнтів з ХХН V стадії (ст.), які лікуються ПГД, на сьогодні як

в Україні, так і за кордоном здійснюють за індексом коморбідності (ІК) за Charlson та співавт. [13], який представляє собою бальну систему оцінки віку хворих та наявності певних супутніх захворювань (зі збільшенням величини ІК відсоток летальних випадків у хворих на ХХН V ст. збільшується, а пацієнти, які лікуються ПГД, вже за рахунок наявності ХХН V ст. мають ІК в 2 бали) [1, 12].

Таким чином, на сьогодні визнана роль цитокинової ланки імунітету та О/А системи в розвитку захворювань нирок, проте ще недостатньо уваги приділено вивченню особливостей реагування цих показників залежно від значень ІК хворих на ХХН VД ст.

Мета роботи - дослідити рівні прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ФНП- α) та О/А балансу крові у хворих на ХХН VД ст., визначити їх особливості та взаємозв'язок залежно від значень ІК.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено комплексне клініко-лабораторне дослідження у 67 пацієнтів (чоловіків – 37, жінок –30) віком від 24 до 65 років (45,05 \pm 0,67р.) із верифікованим діагнозом – ХХН V ст. Хворих на гломерулярні ураження нирок було 33 (49%), негломерулярні ураження нирок – 20 (30%), діабетичну нефропатію – 14 (21%). При постановці клінічного діагнозу й діагностики стадії ХХН дотримувалися класифікації хвороб сечової системи для нефрологічної практики, що затверджена резолюцією II з'їзду нефрологів України. Всім хворим ПГД виконувався за стандартною програмою – 3 рази на тиждень. Тривалість лікування ПГД – 39,15 \pm 3,82 місяців. Діалітичний індекс Kt/V = 1,17 \pm 0,04, де K – кліренс діалізатора за сечовиною (в мл/хв), t – тривалість сеансу ПГД (в хв), V – об'єм розподілу сечовини в організмі (в мл).

Обстежено також 20 практично здорових осіб того ж віку з нормальними аналізами сечі та

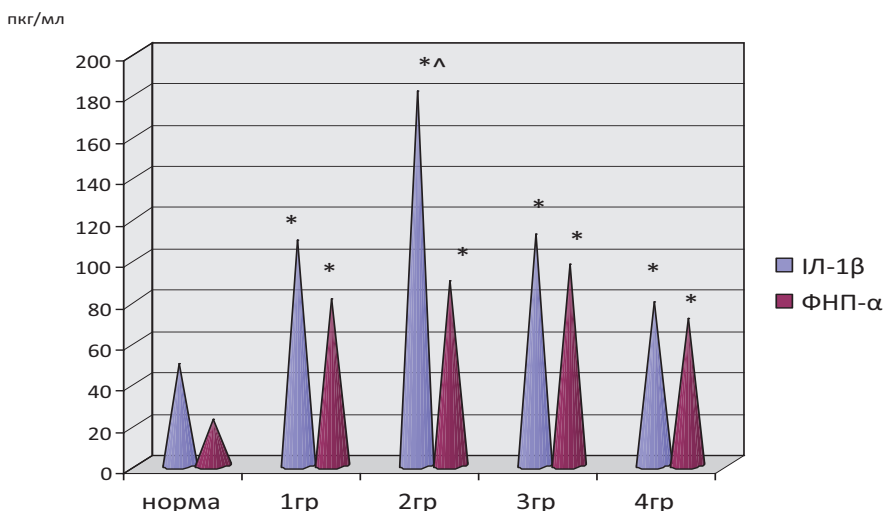
без захворювань нирок в анамнезі (група контролю). Всіх хворих ретроспективно з урахуванням особливостей перебігу хвороби та залежно від ІК поділили на наступні групи: I група (24 хворих) - ІК дорівнював 3 балам; 2 група (21 хворий) - 4 балам; 3 група (15 хворих) - 5 балам та 4 група (7 хворих) - 6 балам.

Кров для дослідження брали з ліктьової вени вранці до проведення сеансу ПГД. Комплекс обстеження, окрім загальноприйнятих методик, включав дослідження компонентів О/А системи крові: визначення вмісту малонового діальдегіду в сироватці крові (МДАС, мкмоль/л) та еритроцитах (МДАЕ, мкмоль/л), вмісту в сироватці крові церулоплазміну (ЦП, г/л) та трансферину (Тр, ум.од.), загальної пероксидазної активності еритроцитів (ЗПАЕ, мкмоль/хв на 1г гемоглобіну) [2]. Рівень цитокінів визначався в сироватках крові за допомогою ІФА, використовували тест-системи "DIACLON" (Франція) і «Вектор Бест» (РФ).

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 Уїлкоксона; для кореляційного аналізу – коефіцієнт Кендала. Достовірно вважали різницю при p<0,05 [7].

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показали достовірне підвищення рівнів вивчених прозапальних цитокінів в крові хворих всіх груп (p<0,001) (рис. 1). Якщо за середнім рівнем ФНП- α групи не відрізнялись між собою (p>0,05), то рівень ІЛ-1 β був найбільш високим в 2 гр. з ІК 4 – 181,0 \pm 22,1 в порівнянні з 46,8 \pm 1,3 пкг/мл у здорових - і достовірно відрізнявся від 1 гр (p<0,001) і 4 гр (p=0,007).

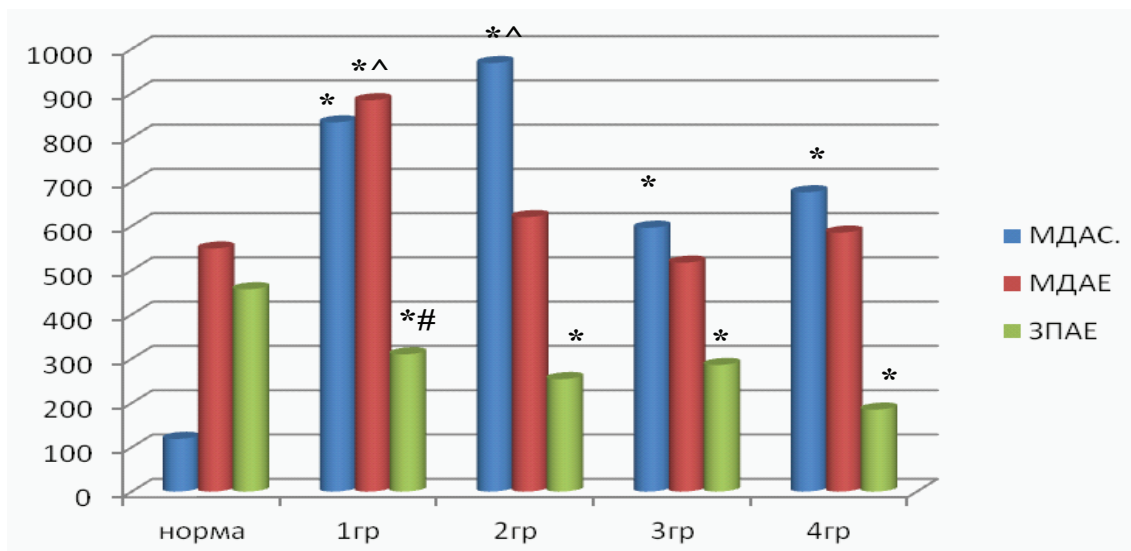


Достовірна різниця: * - із нормою; ^ - між 2 гр і 1, 4 гр. (p<0,05)

Рис. 1. Середній рівень прозапальних цитокінів крові у хворих на ХХН V Д ст. залежно від ІК.

Дослідження активності процесів ПОЛ показало, що у всіх груп хворих на ПГД спостерігається вірогідне накопичення продуктів ПОЛ, а саме МДА у сироватці крові (МДАС, $p < 0,001$), а в еритроцитах (МДАЕ) лише в 1 гр. ($p < 0,05$) (рис. 2) Найбільш високим накопичення МДАС

було в 2 гр., що достовірно відрізнялось як від 1 гр. ($p = 0,036$), так від 3 гр. ($P = 0,019$), в 4 гр. виявлено тенденцію до більш низького рівню ($p = 0,067$), хоча об'єднана група пацієнтів (3+4) достовірно відрізнялась від 2 гр ($p = 0,021$) (рис. 2).



Достовірна різниця ($p < 0,05$) : * - із нормою; ^ - із 3 і 4 гр ($p < 0,05$), # - із 4 гр

Рис. 2. Показники ПОЛ (МДА) і АОЗ (ЗПАЕ) у хворих на ХХН V Д ст. залежно від ІК.

Рівень МДАЕ є найбільш високим у хворих з 1-ї групи, з тенденцією до зниження в 2-й групі ($p = 0,071$) і достовірним зниженням з прогресуванням хвороби, коли різниця з 3-ю групою є достовірною ($p = 0,019$), тобто високе накопичення продуктів ПОЛ в еритроцитах в 1-й і 2-й групах надалі знижується до норми ($p \geq 0,05$) в 3-й і 4-й групах (рис. 2).

Таким чином, високий вміст як МДАЕ (найбільший в 1 гр), так і МДАС (найбільший в 2 гр) при збільшенні ІК (3 і 4) зменшується, хоча і залишається достовірно вищим за показники норми в сироватці крові. На нашу думку, це свідчить про пригнічення гостроти реагування процесів пероксидації у відповідь на несприятливий перебіг хвороби (збільшення частоти ускладнень, пов'язаних з процедурою ПГД, та хвороби в цілому, прогресування метаболічних зсувів та хронічного запалення, зниження залишкової функції нирок тощо) і може бути обумовлено суттєво вираженою ендогенною інтоксикацією, що співпадає з думкою інших авторів [6].

Вивчення стану АОЗ продемонструвало зниження його показників порівняно з нормою. Найбільш виразні зміни зареєстровані в 4-й гр., показники в якій достовірно відрізнялись від 1-ї групи для ЗПАЕ ($p < 0,05$, рис. 2) та для Тр – ($3,3 \pm 0,8$ ум. од. у 1-й групі проти $1,5 \pm 0,2$ ум. од. у 4-й групі, $p = 0,047$), тобто порушення АОЗ прогресували з підвищенням ІК.

На цьому тлі звертає увагу тенденція до підвищення вмісту мідьвмісного антиоксиданту і позитивного білка гострої фази ЦП в сироватці крові хворих з ХХН V ст. вже в 1 гр. ($p \leq 0,1$), яка прогресує до достовірного збільшення в 2 гр ($p \leq 0,05$) по відношенню до показників у здорових, а в 4 гр. вона становить – $0,280 \pm 0,018$ г/л, що в 1,3 рази перевищує показники практично здорових осіб ($0,218 \pm 0,011$, $p \leq 0,05$) та у 1.2 рази показники з 1 гр. ($0,236 \pm 0,010$, $p = 0,048$). Вважаємо, що таке зростання ЦП з підвищенням ІК обумовлено прогресуванням кардіоваскулярних ускладнень у хворих, які лікуються ПГД, що співпадає з думкою інших авторів [1, 5, 11].

Проведено кореляційний аналіз між дослідженими імунологічними та біохімічними показниками в кожній групі хворих. Так, у 1-й гр. відмічено прямий кореляційний зв'язок між показниками МДАЕ та ЗПАЕ ($\text{Tau} = 0,328$, $p = 0,04$) (який особливо виражений у пацієнтів з гломерулярною патологією, $\text{Tau} = 0,462$, $p = 0,03$), а також зворотній зв'язок рівнів МДАЕ із ФНП- α ($\text{Tau} = -0,455$, $p = 0,03$) і ЦП ($\text{Tau} = -0,473$, $p = 0,03$), але надалі в групах 2-4 він не виявляється (лише прямий з МДАС в 4 гр.), що разом з підвищенням рівнів прозапального ІЛ-1 в 2 гр. порівняно з 1 гр і високим його рівнем в 3 гр. порівняно з нормою, свідчить про зростаючий дисбаланс О/А реакцій.

Асоціативних зв'язків між показниками, що досліджувалися, в 2 гр. не зафіксовано (тільки у хворих на ЦД - пряма кореляція між ЦП і ЗПАЕ, 0,741, $p=0,01$), але в 3 гр. зареєстровано зворотній зв'язок між ЗПАЕ і ЦП ($\text{Tau}=-0,599$, $p=0,018$).

Аналіз показав, що на тлі достовірного зниження ІЛ-1в 4 гр. порівняно з 2 гр. ($p=0,007$) і відсутністю змін ФНП- α (перевищує норму в 2 рази), зафіксовано зворотній кореляційний зв'язок ФНП- α із ЗПАЕ ($\text{Tau}=-0,999$, $p=0,014$). Ймовірно, що на тлі максимального зниження резервних можливостей клітин моноцитарно-макрофагальної системи за продукцією ІЛ-1 і високим порівняно з нормою рівнем ФНП- α (можливо, за рахунок продукції іншими клітинами імунної системи) має місце зворотна кореляція між показниками ФНП- α з ЗПАЕ, тобто, можна припустити, що високий рівень в сироватці крові такого прозапального цитокіну як ФНП знижує АОЗ клітин, зокрема що нами показано на прикладі еритроцитів.

Високий рівень ФНП- α у хворих на ХХН V ст. є негативною ознакою, тому що він впливає на ендотелій судин, підсилюючи експресію на ньому молекул адгезії, активує макрофаги, нейтрофіли, підсилює секрецію простагландинів, має хемотаксичну дію на різні клітини, зумовлює синтез білків гострої фази запалення, тобто він регулює цитокіновий каскад та є причиною запалення і місцевої деструктивної реакції [10], а, судячи з наших даних, з прогресуванням ХХН погіршує стан антиоксидантної системи еритроцитів.

Стосовно ІЛ-1, якщо об'єднати хворих 3 і 4 гр., то виявлено прямий кореляційний зв'язок його рівнів з Тр ($\text{Tau}=0,425$, $p=0,02$) і ЦП ($\text{Tau}=0,375$, $p=0,02$), тобто у разі прогресування ХХН та збільшення ІК зниження рівню прозапального монокіну асоціює зі зниженням транспортного білка –антиоксиданту Тр, а підвищення рівню ЦП відбиває погіршення стану серцево-судинної системи і циркуляторної гіпоксії, що також асоціює з виснаженням компенсаторних можливостей клітин за продукцією відповідних цитокінів.

Отже, на фоні дестабілізації О/А системи збільшення вмісту ЦП і асоційована з цим активність прозапальних цитокінів є прогностично несприятливими ознаками щодо стану серцево-судинної та інших систем, що поглиблює наші уявлення і висновки попередніх дослідників [9, 14].

ВИСНОВКИ

1. Хворі на ХХН V Д ст. характеризуються високими рівнями прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ФНП- α) крові та інтенсивністю процесів ПОЛ (МДАС і МДАЕ), найбільш вираженими у хворих з меншим ІК (3-4 бали), і пригніченням процесів пероксидації та функціональної ак-

тивності моноцитів/макрофагів залежно від зростання стану коморбідності.

- У хворих має місце зниження компенсаторно-адапторної спроможності системи АОЗ за даними Тр сироватки крові та ЗПАЕ, найбільш виражене у пацієнтів з найвищим ІК (6 балів), що призводить до дестабілізації О/А процесів в організмі. Зростання з погіршенням ІК рівнів ЦП, що асоційовано (так само як і зниження Тр) з виснаженням функціональної активності клітин за продукцією цитокінів, виступають предикторами прогресування кардіо-васкулярних ускладнень і циркуляторної гіпоксії.
- Показники зростання дисбалансу О/А системи та погіршення резервних можливостей клітин за продукцією прозапальних цитокінів при збільшенні ІК у хворих на ХХН V Д ст. можуть виступати прогностичними маркерами, в тому числі щодо оцінки ефективності терапевтичних заходів та своєчасної корекції метаболічних розладів.

ЛІТЕРАТУРА

- Бикбов Б. Т. Предикторы летального исхода у больных на гемодиализе / Б. Т. Бикбов [и соавт.] // Нефрол. и диализ. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 154-163.
- Біохімічні методи оцінки оксидативного статусу у хворих на хронічну хворобу нирок: метод. рекомендації / уклад. Л. В. Король, Л. Я. Мигаль, Г. Г. Нікуліна, М. О. Колесник; Міністерство охорони здоров'я Ураїни, Національна академія медичних наук України, Український Центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. – К. : [б. в.], 2013. – 30 с.
- Гусев Е. Ю. Хроническое системное воспаление как типовой патологический процесс / Е. Ю. Гусев [и соавт.] // Цитокины и воспаление. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 3-10.
- Красюк Е. Перспективи застосування медикаментозної корекції перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту при хронічній хворобі нирок / Е. Красюк, В. Алексеева // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2010. – № 3 (27). – С. 68-74.
- Лапчинская И. И. Хроническое воспаление у пациентов на гемодиализе / И. И. Лапчинская, Р. М. Кишко, Е. Л. Семенец // Укр. журнал нефрології та діалізу. – 2009. – № 1 (21). – С. 56-63.
- Луцик Б. Д. Клініко-лабораторні критерії діагностики синдрому ендогенної інтоксикації у хворих з гострою кишковою непрохідністю / Б. Д. Луцик [та ін.] // Лаб. діагностика. – 2003. – № 1. – С. 38-41.

7. Лях Ю. Е. Анализ результатов медико-биологических исследований и клинических испытаний в специализированном статистическом пакете MEDSTAT / Ю. Е. Лях, В. Г. Гурьянов // Вестник гигиены и эпидемиологии. – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 155-167.
8. Саенко Ю. В. Роль оксидативного стресса в патологии сердечно-сосудистой системы у больных с заболеваниями почек (Сообщение II. Клинические аспекты оксидативного стресса / Ю. В. Саенко, А. М. Шутов // Нефрол. и диализ. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 138-144.
9. Сусла О. Б. Кальцифікація сонних артерій у хворих із термінальною нирковою недостатністю, які перебувають на хронічному гемодіалізі / О. Б. Сусла [та ін.] // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2010. – № 4 (28). – С. 29-33.
10. Школьник В. В. Імунне запалення та ендотеліальна дисфункція як фактори розвитку гострого інфаркту міокарду / В. В. Школьник, О. А. Кочубей // Врачебная практика. – 2007. – № 3. – С. 6-8.
11. Amann K. Effect of antioxidant therapy with alpha-tocopherol on cardiovascular structure in experimental renal failure / K. Amann, J. Tomig, M. Buzello // *Kidney Int.* – 2002. – Vol. 62. – P. 877-884.
12. Balakrishnan V. S. Cytokine gene polymorphism in hemodialysis patients : Assosiation with comorbidity, functionality and serum albumun / V. S. Balakrishnan [et al.] // *Kidney International.* – 2004. – Vol. 65. – P. 1449-1460.
13. Charlson M. E. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation / M. E. Charlson [et al.] // *J. Chron. Dis.* – 1987. – Vol. 40. – P. 373-383.
14. Gocmen A. Y. Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease ? / A. Y. Gocmen, E. Sahin, E. Semiz // *Can. J. Cardiol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 209-212.
15. Massy Z. A. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management / Z. A. Massy, T. Nguyen-Khoa // *J. Nephrol.* – 2002. – Vol. 15. – P. 336-341.
16. Menon V. Relationship between CRP, albumin and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease / V. Menon, X.Wang // *Am. J. Kidney Disease.* – 2003. – Vol. 42. – P. 44-52.

РЕЗЮМЕ

ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ (ИЛ-1β, ФНО-α) И ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК V Д СТАДИИ С РАЗНЫМ СОСТОЯНИЕМ КОМОРБИДНОСТИ

Дриянская В.Е., Король Л. В., Дударь И.А., Мигаль Л. А., Гончар Ю.И., Шифрис И.М., Малашевская Н.М.

У больных хронической болезнью почек V стадии, находящихся на лечении программным гемодиализом (ХБП V Д ст.), установлена достоверная зависимость активности моноцитарно-макрофагальной системы по уровню провоспалительных ИЛ-1β, ФНО-α крови и компонентов оксидантно-антиоксидантной системы (малонового диальдегида сыворотки крови и эритроцитов, общей активности пероксидазы эритроцитов, церулоплазмينا и трансферрина сыворотки крови) от величин индекса коморбидности, показаны асоциативные связи между показателями.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, провоспалительные цитокины, оксидантно-антиоксидантная система, индекс коморбидности.

SUMMARY

PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES (IL-1β, TNF-α) AND OXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN BLOOD PATIENTS WITH RENAL V D STAGE CHRONIC DISEASE ON THE VALUE OF COMORBIDITY INDEX

Driyanska V. E., Korol L. V., Mygal L. Ya., Dudar I. O., Gonchar Yu. I., Shifris I.M., Malashevskaya N.

In patients with renal V stage chronic disease (RCD V D st.), being on the programme hemodialysis treatment, the distinct dependence of the level in blood IL-1β, TNF-α as pro-inflammatory cytokines and components of the oxidant-antioxidant system (malonic dialdehyde of blood serum and erythrocytes, common activity of erythrocyte peroxidase, ceruloplasmin and transferrin of blood serum) on the value of comorbidity index, associative communications between indicators were stated.

Key words: renal chronic disease, pro-inflammatory cytokines, oxidant-antioxidant system, comorbidity index.