

**SUMMARY**

**THE PRIMARY SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY, A CASE OF PRACTICE**

*N.N. Popov<sup>1</sup>, A.N. Savvo<sup>1</sup>, O.V. Piontkovskaya<sup>2</sup>, A.V. Postnikov<sup>2</sup>, N.I. Timokhina<sup>2</sup>, E.A. Dyachenko<sup>3</sup>, O.N. Plakhotnaya<sup>4</sup>,*

*Kharkiv National University named V.N. Karazin  
Regional Children's Clinical Hospital № 1, Kharkov  
Kharkiv City Children's polyclinic № 14  
Kharkiv National Medical University.*

Combined immunodeficiency - heterogeneous group of diseases characterized by a dysfunction of T and

Bsystems of immunity. These diseases are connected by decrease of T - lymphocytes and immunoglobulins' level in the blood. The most serious disease from the group of combined defects of the immune system is severe combined immune deficiency (SCID), which occurs in the first few months of life. The morbid event of SCID in infants shows the peculiarities of the disease and the difficulty of the differential diagnosis. The disease was diagnosed when child was alive.

**Keywords:** severe combined primary immunodeficiency (SCID), children.

УДК 612.017:616.6-002.2-022.7

**ЕКСПРЕСІЯ ПРОАПОПТОТИЧНОГО МАРКЕРУ CD95 НА ЛІМФОЦИТАХ ТА РІВЕНЬ ПРО- І ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ТА ХРОНІЧНИЙ ПІЄЛОНЕФРИТ**

*ГАЙСЕНЮК Ф.З.*

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика;  
ДУ «Інститут нефрології НАМНУ», м. Київ

Пієлонефрит (ПН) — найпоширеніше захворювання нирок - інфекційне запалення переважно інтерстиціальної тканини нирки та ниркової миски. Клубочки нирок залучаються в патологічний процес лише в пізніх стадіях захворювання. Для гострого пієлонефриту (ГПН) характерна тріада: підвищення температури тіла, яке супроводжується ознобом, біль у попереку та дизуричні явища. Спостерігається напруження м'язів у поперековій ділянці, а іноді і передньої черевної стінки. Пальпація нирок також буває болісною, синдром Пастернацького позитивний. Спостерігаються полакіурія та поліурія. Добовий діурез збільшений; це пояснюється порушенням реабсорбції в канальцях, іноді буває олігурія [6].

При наявності бактеріального збудника як етіологічного агенту ПН моноцити/макрофаги являються антигенпрезентуючими клітинами, що забезпечують початок імунної відповіді організму. В процесі представлення антигену активовані макрофаги секретують цитокіни - ФНП, інтерлейкіни (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, МСР-1 та ін.) [19]. Під їх впливом у вогнищі запалення відбувається активація лейкоцитів, клітин сполучної тканини, ендотелію судин, паренхіматозних клітин, що призводить до синтезу і секреції біологічно активних сполучень з пошкоджуючими, захисними та системними ефектами. Інтенсивна міграція лімфоцитів в зону запалення відбувається після нейтрофілів і моноцитів. Стимульовані лімфоцити секретують лімфокіни, які стимулюють проліферацію та репарацію.

Лейкоцити у вогнищі запалення піддаються дегенерації та видаляються з гнійними масами.

При цьому можливі два шляхи їх загибелі – некроз та апоптоз; останнім шляхом видаляються не тільки нейтрофіли, але й еозинофіли і лімфоцити [5].

Клініка гострого пієлонефриту нагадує важкий інфекційний процес, що характеризується не тільки місцевими порушеннями, але й супроводжується значною інтоксикацією. Тому процес *in situ* не є локальним, клітини периферичної крові також реагують на наявність вогнища запалення та можуть бути здатні до апоптозу.

Хронічний пієлонефрит (ХПН) частіше буває наслідком гострого пієлонефриту, але іноді розвивається неочікувано, поступово. Хронічний пієлонефрит може бути одностороннім і двостороннім, який трапляється приблизно у 30% хворих на хронічний пієлонефрит, що при несприятливому його перебігу загрожує розвитком хронічної ниркової недостатності. Для хронічного пієлонефриту характерні нерівномірність, мозаїчність ураження паренхіми нирки у різних її ділянках. Морфологічна картина різноманітна: на початку захворювання переважає лімфогістіоцитарна інфільтрація, яка поступово заміщується фіброзною тканиною або піддається гнійному розплавленню. У пізніх стадіях гинуть функціонуючі елементи ниркової паренхіми - спочатку канальці, потім клубочки [2].

В процесах загибелі клітин нирки та крові як при гострому, так і хронічному пієлонефриті можуть бути задіяні механізми апоптозу (А) - процесу регульованої клітинної загибелі, який умовно може бути розділений на декілька різних фаз: фаза ініціації апоптозу, проведення сигналу, активація каспаз, активація ендонуклеаз та

специфічна деградація ДНК, в результаті чого настає загибель клітини [3].

Більшість науковців схилиються до думки, що А виникає в результаті взаємодії білків із сімейства факторів некрозу пухлин (TNF) зі специфічними рецепторами. Яскравим представником цієї групи білків є система Fas/Fas-L [1, 4, 12]. Слід зазначити, що для цієї системи невідомі інші функції, крім індукції А клітини. Fas/APO-1/CD-95-рецептор, за структурою відноситься до рецепторів сімейства TNF. Ген Fas у людини локалізований у довгому плечі 10-ї хромосоми і складається з 9-ти екзонів. Взаємодія Fas із Fas-L (лігандом) або з моноклональними антитілами приводить до А клітини. Fas конститутивно експресується на поверхні клітин багатьох типів: на тимоцитах, лімфобластах, активованих Т- і В-лімфоцитах, а також на фібробластах, гепатоцитах, кератиноцитах, мієлоїдних клітинах. Людський Fas складається з 325 амінокислотних залишків і відноситься до мембранних білків I типу. У його структурі можна виділити позаклітинний, трансмембранний і цитоплазматичний домени. Гомологія амінокислотної послідовності серед рецепторів сімейства TNF висока. Приблизно 80 амінокислотних залишків утворюють домен смерті (DD), що взаємодіє з цитоплазматичними білками, генеруючи сигнал смерті. Fas-L експресується на активованих Т-лімфоцитах і натуральних кілерах, що дозволяє цим клітинам убивати будь-яку клітину, у тому числі й активований Т-лімфоцит [12, 16, 17]. Цей механізм визначає появу захищених від імунної системи місць. При зв'язуванні ліганда з рецептором відбувається олігомеризація цитоплазматичних білків: DD, що відноситься до рецептора, адапторного білка - FADD (Fas-асоційований домен смерті), що містить DED - ефекторний домен смерті і прокаспази-8. В результаті цього процесу відбувається активація апоптоз-специфічної протеази - каспази-8 і розвиваються характерні для А процеси. Мутації в гені Fas або в гені Fas-L приводять до розвитку аутоімунних захворювань [10, 13, 14].

Оскільки серед наслідків генетично обумовленого послаблення апоптозу в імунній системі домінують прояви системної аутоімунної патології [18], виникло питання про стан апоптозу та пов'язаних з ним факторів при аутоімунних захворюваннях людини, перш за все системному червоному вовчаку. Прямі порушення експресії Fas-рецептора та Bcl-2 або інших представників цього сімейства при колагенозах, як правило, не визначаються; виявлений одиничний випадок мутації гену Fas-ліганда. В той же час описаний сімейний аутоімунний лімфопроліферативний синдром із генетичним дефектом Fas-рецептора [20].

Хоча при системному червоному вовчаку апоптоз лімфоцитів при відповідних умовах здійснюється, при цьому захворюванні та деяких інших колагенозах (наприклад, ювенільному ревматоїдному артриті) виявлена посилена виробка розчинної форми Fas-рецептору, накопичення якого в мікрооточенні лімфоцитів може перешкоджати реалізації Fas-залежного апоптоза, наприклад, апоптоза активованих лімфоцитів або Т-клітин, які піддаються негативній селекції на периферії. Показано, що у частини хворих на системний червоний вовчак для включення активаційного апоптозу потрібна присутність клітин-індукторів у кількості на 2 порядки більшій, ніж потрібно для розвитку апоптозу активованих Т-клітин здорових людей [15].

Дані про зміни чутливості до індукції апоптозу різних типів клітин при системному червоному вовчаку суперечливі. При вовчаковому нефриті подавляється апоптоз клітин клубочків. З іншого боку, при системному червоному вовчаку нерідко підвищується експресія FasL та реєструється посилення апоптоза лімфоцитів *in vitro*, що корелює із посиленням їх спонтанної активації [15].

При ревматоїдному артриті Т-лімфоцити, присутні в ураженій суглобовій щілині, мають всі ознаки, які сприяють розвитку апоптозу (висока експресія Fas-рецептора та низька - Bcl-2), проте не підлеглі йому; припускається, що в даному випадку спрацьовує деякий механізм, який перешкоджає реалізації апоптоза лімфоцитів (нейтрофіли у суглобових щілинах тих же хворих піддаються масовому апоптозу). При хворобі Бехчета із увеоретинітом ослаблена експресія Fas-рецептора на активованих CD4+ Т-клітинах, що свідчить про потенційне зниження їх чутливості до індукції апоптозу [8, 15].

В теперішній час можна з визначеною впевненістю стверджувати, що апоптоз вносить основний вклад в сумарну клітинну загибель при атеросклерозі. Всі клітинні елементи, які знаходяться в атеросклеротичних бляшках, піддаються програмованій загибелі [9]. За допомогою поєднання імуногістохімічного методу ідентифікації морфологічної належності клітин та специфічних тестів на фрагментацію ДНК був знайдений дуже високий відсоток апоптотичних клітин в атеросклеротичних бляшках людини *in situ* [11]. В ділянках апоптотичних бляшок, збагачених макрофагами, апоптотичний індекс коливався від 10 до 40%.

Апоптоз є загальнобіологічним механізмом, відповідальним за збереження постійної чисельності клітинних популяцій, а також формування та вибраковки дефектних клітин. Порушення регуляції апоптоза призводить до виникнення різних захворювань, пов'язаних з посиленням або інгібуванням апоптозу. Тому ви-

вчення механізмів регуляції різних етапів даного процесу дозволить впливати на його окремі етапи з метою їх регуляції або корекції.

Ідентифікація морфологічних та біохімічних маркерів апоптозу повинна в перспективі сприяти більш глибокому розумінню механізмів патогенезу захворювань, покращенню диференційної діагностики та створенню принципово нових напрямків терапії.

В зв'язку з цим, метою наших досліджень було визначення кількості клітин, які експресують проапоптотичний маркер CD95 (CD95+лімфоцитів), та цитокінового профілю у хворих на гострий та хронічний пієлонефрит.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.**

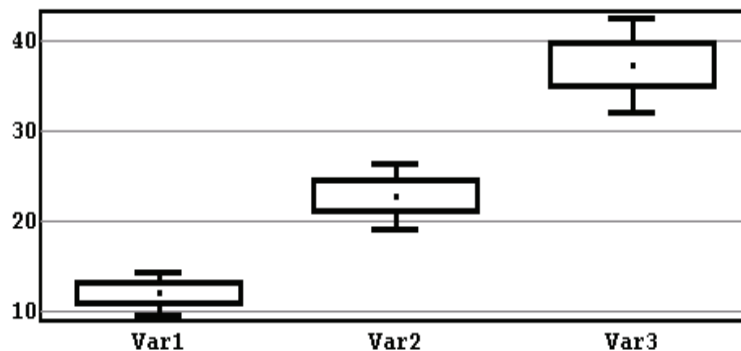
У 25 хворих на гострий та 35 – хронічний пієлонефрит вивчали відносну та абсолютну кількість лімфоцитів крові, що мали поверхневі антигени з кластерами диференціювання CD95 (CD95+ -клітин виконана з використанням флуоресціюючих моноклональних антитіл "Coltage" (США) та люмінесцентної мікроскопії. Рівень про- (ФНП- $\alpha$ , MCP-1) та протизапальних (ІЛ-4,

ТФР- $\beta$ ) цитокінів в сироватці крові визначали за допомогою імуноферментного аналізу, використовували тест-системи «Diaclone» (Франція) і TRG (США). Тестування проводили на аналізаторі Stat Fax 303 Plus. Групою контролю були 25 здорових донорів.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

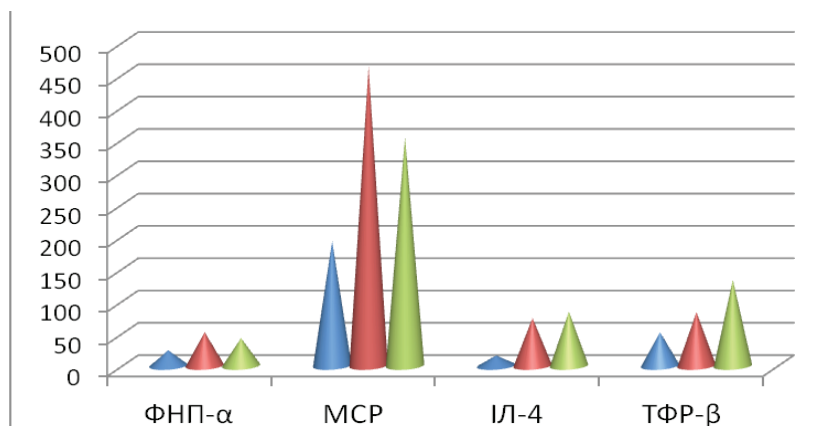
Дослідження відносного числа клітин, що експресують проапоптотичний маркер (Fas/APO-1), показали, що рівень CD95+ -лімфоцитів у хворих на пієлонефрит перевищує показники здорових донорів більш ніж в 2 рази ( $p < 0,001$ ), найбільший рівень демонструють пацієнти 2 групи і різниця між групами також достовірна ( $p < 0,001$ ).

Аналіз цитокінової ланки імунітету у хворих продемонстрував підвищення всіх досліджених показників у хворих на обидві форми пієлонефриту в порівнянні з нормою у здорових і показав, що середні рівні в крові моноцитарного хемоатрактантного протеїну (MCP-1) були достовірно вище при гострому, а трансформуючого фактору росту (ТФР- $\beta$ ) – при хронічному пієлонефриті (рис. 2).



^ - різниця з нормою достовірна; \* - різниця між групами достовірна

Рис. 1. Відносний рівень CD95+ -лімфоцитів крові у здорових донорів (Var 1), хворих на гострий (Var 2) та хронічний (Var 3) пієлонефрит.



^ - різниця з нормою достовірна; \* - різниця між групами достовірна

Рис. 2. Функціональна активність моноцитів/макрофагів (ФНП- $\alpha$ , MCP-1), лімфоцитів (ІЛ-4) та Т-регуляторних клітин (ТФР- $\beta$ ) у здорових донорів (1), хворих на гострий (2) та хронічний (3) пієлонефрит.

Високий рівень проапоптотичного маркера CD95+ у хворих з хронічною інфекцією можна було б частково пояснити підвищеним рівнем ФНП- $\alpha$ , який сприяє розвитку апоптозу. Але кореляційний аналіз не виявив достовірного взаємозв'язку між рівнями в крові CD95+-клітин і ФНП- $\alpha$ . В той же час, виявлено існування кореляційного зв'язку кількості CD95+-клітин з рівнем в крові ТФР- $\beta$  при ХПН – коефіцієнт кореляції Спірмена (K) 0,483 ( $p < 0,05$ ). До того ж, найбільш високий рівень CD95+-клітин, так само як і ТФР- $\beta$ , має місце саме у хворих на ХПН.

Таким чином, у хворих на ХПН на фоні тривалого хронічного запалення виявлено більш високий рівень експресії проапоптотичного маркера CD95 на лімфоцитах, ніж при ГПН, що може сприяти апоптозу клітин та ще більшим змінам імунітету. Але можна сподіватись, що високий рівень ТФР- $\beta$ , виявлений нами у хворих з хронічною інфекцією нирок, сприяє антиапоптотичному ефекту, описаному деякими авторами і показавшими, що в умовах експерименту видалення факторів росту з культури клітин призводить до їх апоптозу [7].

## ВИСНОВКИ

Дослідження хворих на гострий та хронічний пієлонефрит показали підвищений рівень в крові таких цитокінів як ФНП- $\alpha$  і ТФР- $\beta$  на тлі високої кількості клітин з проапоптотичним маркером CD95+, що свідчить про активацію клітин імунної системи. В той час як більша активація лімфоцитів на фоні хронічного запалення являється більшим фактором ризику апоптозу, ніж при гострому, більш високий рівень в сироватці крові протизапального цитокіну ТФР- $\beta$ , що корелює з експресією CD95, скоріш за все, є захисною реакцією та запобігає підвищеному апоптозу імунокомпетентних клітин, що є позитивним фактом, хоча, з іншої сторони, як просклеротичний фактор, може прискорювати фіброз та погіршення функції нирок. Вважаємо, що для перебігу пієлонефриту у окремого хворого важливим є баланс між вищезазначеними факторами імунітету, що можна використовувати як маркер прогнозування.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Аббасова С .Г. Система Fas-FasL в норме и при патологии / С. Г. Аббасова [и др. ] // Вопросы биол. мед. и фарм. Химии. - 1999. - № 3. - С. 3-16.
2. Дядык А. И. Инфекции почек и мочевыводящих путей / А. И. Дядык, Н. А. Колесник. – Д. : КП «Регион», 2003. – 400 с. – ISBN 966-7696-63-4.

3. Паунова С. С. Апоптоз – физиология и патология / С. С. Паунова // Нефрология и диализ. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 132-137.
4. Потапнев М. П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М. П. Потапнев // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237-243.
5. Синюхин В. Н. Иммунологические аспекты пиелонефрита / В. Н. Синюхин, Л. В. Ковальчук // Урология. – 2002. - № 1. – С. 7-11.
6. Яковлев С. В. Пиелонефрит в практике врача-терапевта. Инфекции в амбулаторной практике / С. В. Яковлев // М.: Центр по биотехнологии, медицине и фармации. – 2002. – С. 74-81.
7. Abastado J. P. Apoptosis : function and regulation of cell death / J. P. Abastado [et al. ] // Res. Immunol. - 1996. - Vol. 147. – P. 443-456.
8. Altnauer F. Inflammation-associated cell cycle-independent block of Apoptosis by Survivin in terminally differentiated neutrophils / F. Altnauer [et al. ] // J. Exp. Med. – 2004. – Vol. 199, N 10. – P. 1343-1354.
9. Bennet M. R. Deregulated c-myc oncogene expression blocks vascular smooth muscle cell inhibition mediated by heparin, interferon mitogen depletion and cyclic nucleotide analogues induces apoptotic cell death / M. R. Bennet [et al. ] // Circ Res. - 1994. - 74. – P. 525-536.
10. Creagh Emma M. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity / Emma M. Creagh [et al. ] // Immunological Reviews. – 2003. - Vol. 193, Issue 1. - P. 10.
11. Han D. K. M. Evidence for Apoptosis in Human Atherogenesis and in a Rat Vascular Injury Model / D. K. M. Han [et al. ] // Am. J. Pathol. – 1995. - 147 (2). – P. 267-77.
12. Janssen S. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte population / S. Janssen [et al. ] // Cell Tissue Res. – 2000. – Vol. 301. – P. 85-99.
13. Kaser H. E. The role of apoptosis in normal ontogenesis and solid human neoplasm / H.E. Kaser, B. Bodey // In Viv. – 2000. – Vol. 14, N 6. – P. 789-803.
14. Kminner P. H. CD95's deadly mission in the immune system / P. H. Kminner // Nature. – 2000. – Vol. 37, N 5. – P. 386-401.
15. Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation / A. Meager // Cytokine and growth factor reviews. – 1999. – Vol. 10. – P. 27-39.
16. Neuwirtova R. Will knowledge of the mechanisms of apoptosis lead to new therapeutic procedures ? / R. Neuwirtova // Cas. Lek. Cesk. – 2001. – Vol. 140 (15). – P. 460-464.

17. *Nicholson D. W.* Apoptosis. Life and death decisions / D. W. Nicholson, N. A. Thornberry // *Science*. – 2003. – Vol. 299, suppl. 5604. – P. 223-226.
18. *O'Reilly L.* Apoptosis and autoimmune disease / L. O'Reilly, A. Strasser // *Inflamm. Res.* – 1999. – Vol. 48. – P. 5-21.
19. *Satish L.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) : An Overview. J. / L. Satish [et al. ] // *J. of interferon & cytokine research*. - 2009. - Vol. 29. - № 6. - P. 3313-326.
20. *Tsujimoto Y.* Bcl-2 Family : life-or-death switch / Y. Tsujimoto, S. Shimizu // *FEBS*. – 2000. – Vol. 466, N 1. – P. 6-10.

### РЕЗЮМЕ

#### ЭКСПРЕССИЯ ПРОАПОПТОТИЧЕСКОГО МАРКЕРА CD95 НА ЛИМФОЦИТАХ И УРОВЕНЬ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ И ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ

Гайсенюк Ф.З.

НМАПО им. Шупика, кафедра урологии;  
ГУ «Институт нефрологии НАМНУ», г. Киев

У больных острым (ОПН) и хроническим пиелонефритом (ХПН) выявлено достоверное повышение

числа CD95+-клеток крови на фоне высоких уровней ФНО- $\alpha$ , MCP-1, ИЛ-4 и ТФР- $\beta$  в сыворотке крови. Больные ХПН характеризовались наиболее высокой экспрессией молекул CD95 и уровня ТФР- $\beta$ .

**Ключевые слова:** CD95+-лимфоциты, цитокины, острый и хронический пиелонефрит.

### SUMMARY

#### EXPRESSION OF PROAPOPTOTIC MARKERS CD95 ON LYMPHOCYTES AND THE LEVELS OF PRO- AND ANTIINFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH ACUTE AND CHRONIC PYELONEPHRITIS

Gaysenyuk F.Z.

National Medical Academy of Postgraduate Education  
name P. L. Shupyk, Department of Urology;  
Institute of Nephrology AMS of Ukraine, Kyiv

It has been demonstrated that CD95+-lymphocytes, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-4 and TGF- $\beta$  in blood were increased in patients with acute and chronic pyelonephritis, compared with healthies. The number of lymphocytes expressing CD95 and the level of TGF- $\beta$  were higher in patients with chronic pyelonephritis.

**Key words:** CD95+-lymphocytes, cytokines, acute and chronic pyelonephritis

УДК 612.017.1:611.018.53:616-008:577.152

### ДЕФИЦИТ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ – ВРОЖДЕННОЕ И ПРИОБРЕТЕННОЕ НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ

КАЗМИРЧУК В.Е.<sup>1</sup>, ЦАРИК В.В.<sup>2</sup>, МАЛЬЦЕВ Д.В.<sup>1</sup>, ВОЙТЮК Т.В.<sup>1</sup>,  
СИДОРЕНКО Е.В.<sup>1</sup> ДЮСЕЕВА В.В.<sup>1</sup> СОЛОНЬКО И.И.<sup>1</sup>

Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца

<sup>1</sup>Институт иммунологии и алергологии

Как известно, при попадании патогена в организм, весь процесс защиты начинается с поглощения клеткой крупных макромолекулярных комплексов или корпускулярных чужеродных структур. После того, как фагоцит захватывает своей мембраной поглощенный объект и заключает его в фагосому, происходит многоэтапный процесс распознавания антигена, состоящий из каскадного механизма переработки (процессинга) чужеродного материала.

Нарушение любого процесса в этом каскаде приводит к снижению сопротивляемости организма к чужеродным патогенам и развитию рецидивирующей, а также хронической инфекционной патологии. Нарушение вышеизложенного физиологического процесса приводит также и к аллергическим заболеваниям. Ведь с древних

времен в медицине использовали память воды и других субстанций, на которых записывали антигенные свойства патогена. В те времена еще не были известны механизмы иммунного ответа на распознанный аллерген (антиген), что используется сегодня при гипосенсибилизации. Однако, целителям того времени удавалось научить организм воспринимать аллерген как антиген. Сегодня данный механизм лечения гипосенсибилизацией является «золотым стандартом» лечения аллергии.

**Определение. Миелопероксидаза (МРО)** – фермент нейтрофилов. Фермент располагается в лизосомах белых кровяных клеток, гем-содержащий белок. Миелопероксидаза – маркер клеток миелоидного ряда. Активность фермента повышается по мере созревания