© Дріянська В. Є., Дудар І. О., Шіфріс І. М., Гончар Ю. І., Лобода О. М., Гайсенюк Ф. З., Крот В. Ф., 2016

УДК 616.61-008.64-036.12-078.73

ДРІЯНСЬКА В. Є., ДУДАР І. О., ШІФРІС І. М., ГОНЧАР Ю. І., ЛОБОДА О. М., ГАЙСЕНЮК Ф.З., КРОТ В. Ф.

ЦИТОКІНОВА ЛАНКА ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА ХХН V СТ., ЯКІ ЛІКУЮТЬСЯ МЕТОДАМИ ГД, ГДФ АБО ПД

DRIYANSKA V.E., DUDAR I.O., SHIFRIS I., GONCHAR YU.I., LOBODA O.M., GAISENIUK F.Z., KROT V.F.

CYTOKINE IMMUNITY IN CKD PATIENTS TREATED WITH HD, HDF, PD

Державна установа «Інститут нефрології Національної академії медичних наук України»

SI «Institute of Nephrology of the National Academy of Medical Sciences»

Ключові слова: *хронічна хвороба нирок V стадії, прозапальні цитокіни, ниркова замісна терапія.*
Key words: *chronic kidney disease V stage, pro-inflammatory cytokines, renal replacement therapy.*

Резюме. *Вступ. Цитокіни грають провідну роль в запальних процесах та розвитку ендотеліальної дисфункції і тому займають важливе місце в проблемі системного хронічного запалення (СХЗ) у пацієнтів з ХХН V ст., що лікуються методами замісної ниркової терапії (ЗНТ).*

Мета роботи - визначити особливості про- та протизапальних цитокінів, СЕФР у хворих на ХХН V Д ст. залежно від методу ДНЗТ (ГД , ГДФ, ПД).

Матеріали і методи. Обстежено 56 хворих на ХХН V Д ст.: 1 гр. - отримують лікування гемодіалізом (ГД) (15 хв), 2 гр – гемодіафільтрацією (ГДФ) (28 хв) і 3 гр – перитонеальним діалізом (ПД) (13 хв). Рівень цитокінів (ІЛ-6, -8, -10, -18, ФНП-б, СЕФР) визначався у сироватці крові за допомогою ІФА.

Результати. У хворих на ХХН VД ст. визначено достовірно підвищені рівні прозапальних цитокінів крові (ФНП- , ІЛ-8, ІЛ-18) (p < 0,001) та важливого фактора ендотеліальної дисфункції - СЕФР, групи 1-3 не відрізнялись (p > 0,05). При порівнянні з здоровими донорами у пацієнтів 3 гр рівень протизапального ІЛ-10 найбільш високий (p < 0,001) порівняно з 1 гр (p = 0,080) та 2 гр (p = 0,043) (відповідно, ГД та ГДФ), а співвідношення ІЛ-18/ІЛ-10 – достовірно більш низьке порівняно з обома іншими групами (p = 0,035).

Заключення. Високий рівень сироваткових цитокінів підтверджує наявність СХЗ у хворих на ХХН V Д ст., у пацієнтів, які лікуються ПД, відмічено менший ступінь запальних реакцій за даними балансу між про-/протизапальним медіаторами імунітету.

Summary. *Introduction. Cytokines play the corresponding role in the inflammatory processes and the development of endothelial dysfunction and therefore take an important place in the problem of systemic chronic inflammation (SCI) in patients with chronic kidney disease (CKD), stage V, who are treated with methods of the renal replacement therapy (RRT).*

Aim of the work was to determine the features of pro- and anti-inflammatory cytokines, VEGF in patients with CKD stage V D, depending on the method of RRT (HD, HDF, PD).

Materials and methods. There were examined 56 patients with CKD, st. V treated with methods of RRT: gr.1 received hemodialysis (HD) (15 p), gr. 2 - hemodiafiltration (HDF) (28 p) and gr. 3 – peritoneal dialysis (PD) (13 p). The cytokines levels (IL-6, -8, -10, -18, TNF-α, VEGF) were determined in blood serum by means of ELIZA.

Results. The CKD, st. V patients treated with RRT showed really increased levels of pro-inflammatory blood cytokines (TNF-α, IL-8, IL-18) (p < 0.001) and VEGF as important factor of endothelial dysfunction, in dependence on RRT the groups 1-3 did not differ (p > 0.05). In comparison with healthy donors, in patients of gr. 3 the level of anti-inflammatory IL-10 was the highest (p < 0.001) in comparison with gr.1 (p = 0.080) and gr.2 (p = 0,043) (corresponding HD and HDF), and the ratio IL-18/IL-10 was really more low in comparison with both other groups (p = 0.035).

Conclusion. The high level of serum cytokines confirms the SCI availability in patients with CKD,st.V; the patients treated with PD showed the lower degree of inflammatory reactions by the data of balance between pro/anti-inflammatory immunity mediators.

Дріянська Вікторія Євгенівна
kirin@inephrology.kiev.ua

ВСТУП. Протягом останніх років привертає увагу проблема системного хронічного запалення (СХЗ) у хворих на ХХН V стадії (ст.), які лікуються різними методами діалізної ниркової замісної терапії (ДНЗТ). 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 [1].

Відомо, що реалізація запалення, в тому числі хронічного у хворих на ХХН V Д ст., базуються на важливій ролі прозапальних цитокінів, які є обов'язковими чинниками здійснення ендогенної регуляції всіх ланок імунітету, гемопоезу, запалення і міжклітинної взаємодії [6, 7, 10]. Вони приймають участь в регуляції проліферації Т- та В-клітин, цитотоксичних лімфоцитів, фагоцитозу, індукують синтез інтерферонів, хемоатрактантів, адгезивних молекул (ICAM-1, VCAM-1), колагена, активують фібробласти та коагуляцію [5, 11, 18], впливають на механізми апоптозу та розвиток атеросклеротичних уражень [3] .

При запаленні послідовно секретуються ІЛ-1, ФНП-α, особливості яких ми описували [2], а також такий цікавий цитокін як ІЛ-6 [12, 14]. Він виробляється не тільки клітинами імунної системи та допоміжними клітинами, що мають імунні функції (моноцитами, макрофагами, лімфоцитами, ендотеліоцитами, астроцитами і клітинами мікроглії), але й клітинами, що не мають прямого відношення до імунної системи (остеобластами, клітинами строми кісткового мозоку, кератиноцитами, синовіальними клітинами, хондроцитами та ін.). З часом при тривалому розвитку запалення ІЛ-6 починає пригнічувати секрецію ФНП-α та ІЛ-1, активувати продукцію печінкою білків гострої фази запалення і стимулювати гіпоталамо-гіпофизарно-надниркову систему [9], що сприяє регуляції запального процесу. В цьому аспекті ІЛ-6 можна розглядати і як прозапальний, і як протизапальний цитокін. Особливий інтерес клініцистів до ІЛ-6 пояснюється різноманітним характером його дії, участі не тільки в процесі запалення, але і в регуляції функцій ендокринної системи та обміну речовин.

Сучасні дослідження спрямовані на дослідження ролі ІЛ-18 – прозапального цитокіну, який належить до сімейства ІЛ-1, синтезується макрофагами та іншими клітинами і відіграє значну роль при інфекційних та аутоімунних захворюваннях. ІЛ-18 у вигляді неактивного пропептиду массою 24 кДа після протеолітичного розщеплення під дією ICE (інтерлейкін-1 в перетворювального ензиму) або іншої каспази перетворюється в зрілий активний пептид з молекулярною масою 18 кDa. Представляє інтерес як IFN-г індукуючий фактор (IGIF), і ця його здатність навіть вище, ніж у головного стимулятора – ІЛ-12 [15]. Високі показники ІЛ-18 знаходять у вогнищах хронічного запалення, при аутоімунних захворюваннях та в онко-утворюваннях; вважають, що цей цитокін приймає участь в стимуляції запалення та розвитку атеросклерозу [8].

В розвитку хронічного запалення у хворих на ХХН, провідну роль відіграє розвиток дисфункції ендотелію, яку можна вважати дисбалансом між медіаторами, які забезпечують оптимальний перебіг всіх ендотелійзалежних процесів [1, 19], і важливу роль грають фактори росту.

Відомо, що під дією трансформуючого фактору росту - ТФР-β знижується експресія судинного ендотеліального фактору росту (СЕФР) у нирці і зникає здатність ендотелію до проліферації/регенерації. Це, в свою чергу, призводить до підвищення чутливості ендотеліальних клітин до апоптозу і, як наслідок, тубулоінтерстиціального склерозування та втрати функції нирок [3, 4].

СЕФР є ангіогенним фактором, який індукує проліферацію клітин ендотелію і судинне проникнення. Останні дослідження не виключають, що цей фактор може сприяти міграції макрофагів [13]. В нормі експресується подоцитами і стимулює проліферацію/регенерацію ендотелію, що призводить до відновлення гломерулярних та перитубулярних капілярів та зниження площі гломерулярного та інтерстиціонального фіброзу [16]. Порушення регуляції або стимуляції процесу ангіогенезу без функціональних потреб організму призводять до ангіогенної форми дисфункції ендотелію і далі до негативних наслідків, в тому числі для нирок [17].

Таким чином, вищенаведені цитокіни грають провідну роль у запальних процесах та розвитку ендотеліальної дисфункції і тому займають важливе місце в проблемі системного хронічного запалення (СХЗ) у пацієнтів з ХХН V Д ст. та впливають на якість їх життя й коморбідність.

МЕТОЮ роботи було визначити особливості про- (ІЛ-6, -8, -18, ФНП-α) і протизапального (ІЛ-10) цитокінів та СЕФР у хворих на ХХН V Д ст. залежно від методу ДНЗТ (ГД , ГДФ, ПД).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Для оцінки особливостей цитокінової ланки імунітету у хворих на ХХН IV-V ст було обстежено 184 пацієнти, що лікувалися протягом останніх років у відділі еферентних технологій ДУ «Інститут нефрології НАМН України» на базі міського нефрологічного центру лікарні №3 м. Києва: 48 хворих на ХХН IV-V ст. у додіалізному і 136 – у діалізному періоді. При постановці клінічного діагнозу й діагностики стадії ХХН дотримувалися класифікації хвороб сечової системи для нефрологічної практики, що затверджена резолюцією II з'їзду нефрологів України.

Для оцінки особливостей рівнів ряду цитокінів залежно від використання різних методів ДНЗТ було обстежено 56 хворих на ХХН V ст.: для аналізу вони були поділені на 3 групи: 1 гр. - отримують лікування ГД (15), 2 гр – ГДФ (28) і 3 гр – ПД (13).

Рівень цитокінів визначався в сироватках крові за допомогою імуноферментного методу на аналізаторі «SunRise TouchScreen»; використовували тест-системи «Вектор Бест» (РФ) і DRG (Німеччина). Референтну групу складали 25 здорових донорів.

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 непараметричні – критерій Уілкоксона. Достовірною вважали різницю при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження сироваток крові хворих з ХХН IV-V ст. у додіалізному (I) та діалізному (II) періодах ппродемонструвало підвищення рівнів прозапальних цитокінів - ІЛ-1 майже в 1,5 рази в обох групах у порівнянні з нормою ($p \leq 0{,}001$), достовірної різниці між групами не виявлено (p = 0,193). Рівень ФНП-α у хворих був високим, і в II групі достовірно вищим, ніж у хворих, що не лікуються діалізом (p = 0,045). Середній рівень моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 (МХП-1), високий у пацієнтів обох груп, був достовірно вище у додіалізних пацієнтів – 557,4 ± 36,2 порівняно з 348,8 ± 28,4 (p = 0,003).

Прозапальний лімфокін ІЛ-23 також підвищений у пацієнтів з ХХН IV- V ст. - 8,4 [4,3; 23,8] у порівнянні з нормою – 2,7 [1,9; 4,9] (p = 0,010), різниці між групами не виявлено. Аналогічні результати отримані при дослідженні СЕФР, рівень якого також був високим, достовірної різниці між групами не виявлено (p = 0,907).

Протизапальний ІЛ-10, високий у досліджених пацієнтів, у діалізних достовірно нижче, ніж в групі I (p = 0,042).

Показано достовірне підвищення сироваткового рівня гама-ІФ у всіх хворих ($p \leq 0{,}001$), і найбільші показники відмічені у пацієнтів, що лікуються діалізом - 121,5 ± 3,0 порівняно з 107,5 ± 3,2 пкг/мл (p = 0,006). Аналіз виявив достовірну різницю співвідношення рівнів в крові гама-ІФ/ІЛ-10 і гама-ІФ/TGF-в 1, які до діалізу були менше 1 (0,52 та 0,54), а у хворих, що лікуються діалізом – більше одиниці (1,15 та 1,10) (p < 0,001).

Таким чином, виявлено високий рівень прозапальних цитокінів в сироватці крові хворих з ХХН IV-V ст., що свідчить про активацію клітин, найбільш виражену для моноцитів/макрофагів (продукція ІЛ-1, ФНП-α, МХП-1), Т-хелперів 1 (гама-ІФ) і Т-хелперів 17 (ІЛ-17) у тих пацієнтів, які лікуються діалізом (за винятком МХП-1). Лікування ДНЗТ змінює баланс про/протизапальних цитокінів у бік превалювання прозапальних медіаторів, що є додатковим фактором ризику прогресування хронічного запалення у пацієнтів.

Тому особливий інтерес представляли дослідження щодо рівнів медіаторів імунітету у пацієнтів в динаміці під впливом лікування різними методами ДНЗТ (ГД , ГДФ, ПД).

Дослідження цитокінової ланки показали, що у хворих на ХХН V ст., які лікуються методами ГД та ГДФ, достовірно підвищені досліджені цитокіни (рис. 1, 2), за винятком ІЛ-6, який не відрізнявся від норми, хоча і мав тенденцію до підвищення при терапії з використанням ГД і ГДФ (p = 0,076) (рис. 1).

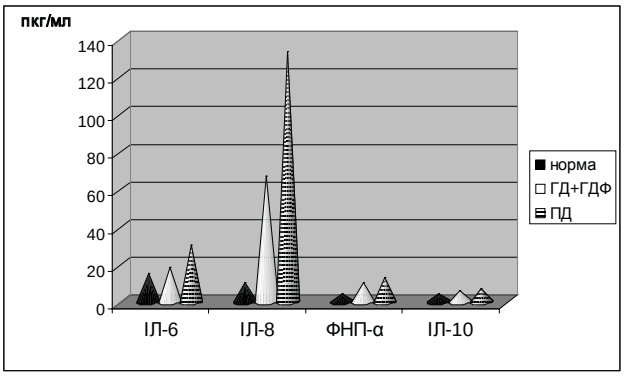


Рис. 1. Середні рівні про- (ІЛ-6, -8, ФНП-б) і протизапального (ІЛ-10) цитокінів у хворих, які лікуються методами ГД, ГДФ (2) та ПД (3) у порівнянні з показниками здорових донорів (1).

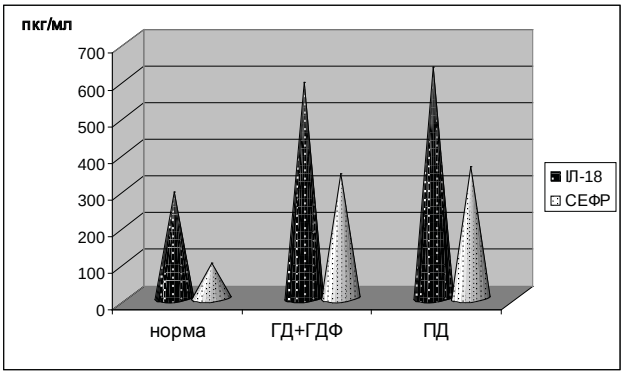
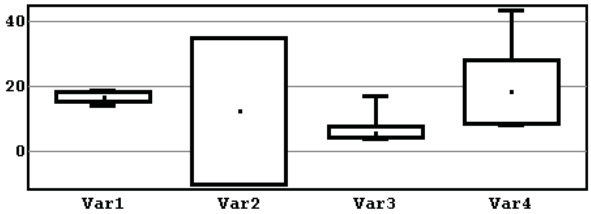


Рис. 2. Середні рівні ІЛ-18 і СЕФР у хворих, які лікуються методами ГД і ГДФ, а також ПД у порівнянні з показниками здорових донорів.

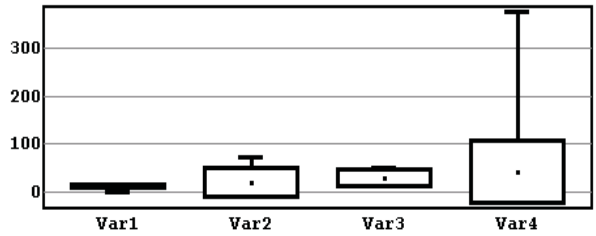
Аналіз груп, що відрізнялись методами замісної ниркової терапії, показав, що рівень ІЛ-6 не відрізнявся від норми лише при лікуванні ГД та ПД, тоді як при використанні ГДФ він достовірно нижче здорових донорів (рис. 3). Порівняння груп між собою показало, що цей показник був також достовірно нижче порівняно з 3 гр. та має тенденцію до більш низького рівня, ніж в 1 гр. (рис. 3).



$P_{2-3=}$ ***0,092,*** $P_{2-4=}$ 0,107, $P_{3-4=}$ **p=0,001**

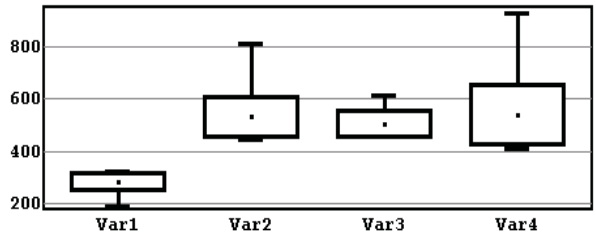
Рис. 3. Середні рівні ІЛ-6 у здорових донорів (Var 1), хворих на ХХН V ст., які лікуються ГД (Var 2 - 15), ГДФ (Var 3 - 28) та ПД (Var 4 - 13).

Рівні прозапальних ІЛ-8, -18 та ФНП-б, так само як і СЕФР, достовірно вище норми в усіх трьох групах, між собою групи за цими показниками не відрізнялись (рис. 4-7).



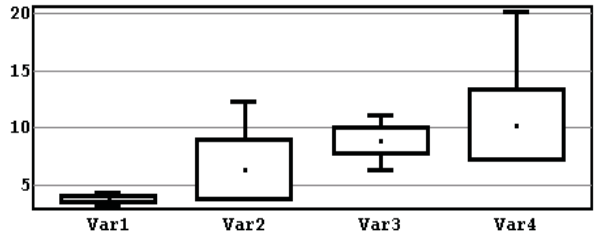
P_{2-3}=0,693, P_{2-4}=0,345, P_{3-4}=0,449

Рис. 4. Середні рівні ІЛ-8 у здорових донорів (Var 1), хворих на ХХН V ст., які лікуються ГД (Var 2 - 15), ГДФ (Var 3 - 28) та ПД (Var 4 - 13).



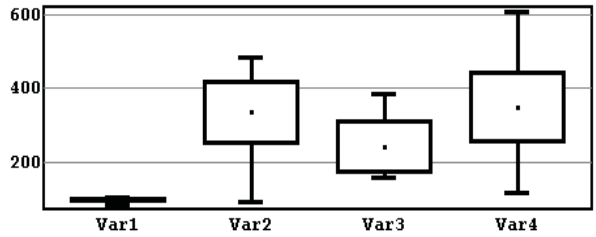
P_{2-3}=0,593, P_{2-4}=0,800, P_{3-4}=0,867

Рис. 5. Середні рівні ІЛ-18 у здорових донорів (Var 1), хворих на ХХН V ст., які лікуються ГД (Var 2 - 15), ГДФ (Var 3 - 28) та ПД (Var 4 - 13).



P_{2-3}=0,326, P_{2-4}=0,097, P_{3-4}=0,287

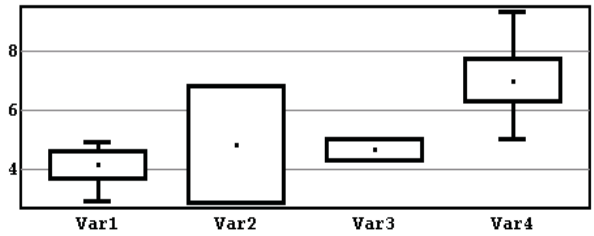
Рис. 6. Середні рівні ФНП-б у здорових донорів (Var 1), хворих на ХХН V ст., які лікуються ГД (Var 2 - 15), ГДФ (Var 3 - 28) та ПД (Var 4 - 13).



P_{2-3}=0,929, P_{2-4}=0,774, P_{3-4}=0,834

Рис. 7. Середні рівні СЕФР у здорових донорів (Var 1), хворих на ХХН V ст., які лікуються ГД (Var 2 - 15), ГДФ (Var 3 - 28) та ПД (Var 4 - 13).

Аналіз протизапального ІЛ-10 продемонстрував, що у пацієнтів, які лікуються ПД, спостерігається його найбільш високий середній рівень, який відрізняється як від норми, так і від інших двох груп (рис. 8); при лікуванні ГД показники не відрізняються від контролю, а при ГДФ вище норми, але менш виражено, ніж в 3 гр. (рис. 8).



P_{2-3}=0,693, P_{2-4}=**0,024**, P_{3-4}=**0,001**

Рис. 8. Середні рівні ІЛ-10 у здорових донорів (1), хворих на ХХН V ст., які лікуються ГД (2), ГДФ (3) та ПД (4)

Індивідуальний аналіз показав, що у 92 % хворих, які лікуються ПД, рівень протизапального лімфокіну ІЛ-10 вище норми, тоді як в інших групах – відповідно, 53 % (1гр) та 43 % (2 гр) ($p < 0,05$), що вважаємо позитивною ознакою на фоні високого рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-8, -18, ФНП-б) в усіх групах. Показник ІЛ-18/ІЛ-10 був достовірно більш низьким у хворих, які лікувалися ПД (3 гр) (рис. 9), що дозволяє оцінювати як позитивну ознаку і сподіватись на менш виражений стан системного запалення у цих хворих.

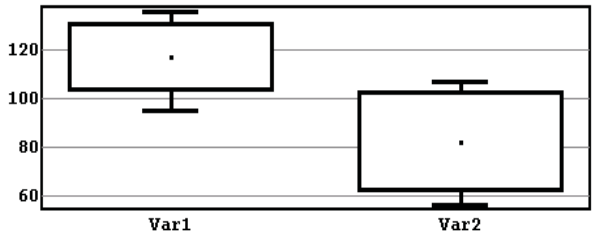


Рис. 9. Співвідношення ІЛ-18/ІЛ-10 у хворих, які лікуються ГДФ (Var 1) та ПД (Var 2).

Таким чином, визначено високі рівні прозапальних цитокінів (ІЛ-8, -18, ФНП-α) та СЕФР як фактора ендотеліальної дисфункції в усіх групах хворих на ХХН VД ст., які лікуються різними методами ДНЗТ. В 1 і 3 гр. відсутність різниці з нормою ІЛ-6 можемо трактувати як виснаження на фоні тривалого хронічного запалення продукції цього цитокіну, який має прозапальні властивості, але й чинити протизапальну дію, пригнічуючи на відповідному етапі високі рівні ІЛ-1 та ФНП-б (підвищеного у наших хворих в 2-3 рази). Рівень протизапального ІЛ-10 був найбільш високим, а співвідношення ІЛ-18/ІЛ-10 – достовірно більш низьким при лікуванні ПД, що характеризує менший ступінь запальних реакцій і є позитивним для хворих.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Гусев Е. Ю.* Хроническое системное воспаление как типовый патологический процесс / Е. Ю. Гусев, Л. Н. Юрченко, В. А. Черешнев, Ю. А. Журавлева, Л. В. Соломатина // Цитокины и воспаление. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 3-10.
2. *Дріянська В. Є.* Прозапальні цитокіни (ІЛ-1β, ФНП-α) та оксидантно-антиоксидантний баланс крові хворих на хронічну хворобу нирок

V Д стадії з різним станом коморбідності / В. Є. Дріянська, Л. В. Король, І. О. Дудар [та ін.] // Імунологія та алергологія. Наука і практика. – 2014 - № 1 – С. 25-30.

3. *Семенов В. Н.* Апоптоз и его роль в патогенезе критических состояний / В. Н. Семенов, И. Н. Пасечник // Вестн. интенсивн. тер. — 2004. — № 1. — С. 3-7.
4. *Синяченко О. В.* Ремоделирование тубулоинтерстиция и роль нефропротекции в прогрессировании хронических гломерулонефритов / О. В. Синяченко, Г. А. Игнатенко, И. В. Мухин // Нефрология. – 2006. - № 1. – С. 99-102.
5. *Татарко С. В.* Імунологічні механізми хронізації запалення : автор. ... д. мед. наук : 14.03.04 / С. В. Татарко. – Харків, 2011. – 35 с.
6. *Фрейдлин И. С.* Регуляторные Т-клетки: Происхождение и функции / И. С. Фрейдлин // Мед. иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 347-354.
7. *Akhurst R.* Targeting the TGFbeta signaling pathway in disease / R. Akhurst, A. Hata // Nat Rev Drug Discov. – Vol. 11. – 2012. – P. 790-811.
8. *Charles A. D.* Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process / F. D. Charles // American Journal of Clinical Nutrition – 2006. - Vol. 83, No. 2. – P. 447S - 455S.
9. *Chaudhry A.* Occurrence of pyuria and bacteriuria in asymptomatic hemodialysis patients / A. Chaudhry, W. J. Stone, J. A. Breyer // Am J Kidney Dis. - 1993. - 21. - P. 180-183.
10. *Cooke A.* Th17 Cells in Inflammatory Conditions / A. Cooke // Rev. Diabet. Stud. – 2006. – No. 3 (2). - P. 72-75.
11. *Halwani R.* Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma / R. Halwani, S. Al-Muhsen, H. Al-Jahdali,Q. Hamid // Am.J.Respir Cell.Mol.Biol. – Vol. 44. – 2011. – P. 127-133.
12. *Klahr S.* The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease / S. Klahr, J. M. Jeremiah // Kidney Int.- 2000. - Suppl. 75. - P.7-14.
13. *Ostalska-Nowicka D.* Vascular endothelial growth factor (VEGF-C1)-dependent inflammatory response of podocytes in nephrotic syndrome glomerulopathies in children: an immunohistochemical approach / D. Ostalska-Nowicka [et al.] // Histopathology. - 2007. - 46 (2). – P. 176–183.
14. *Rao M.* Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases / M. Rao [et al.] // Kidney International. – 2007. – 72. – P. 549–556.
15. *Sugama S.* Interleukin-18 and stress. Brain research reviews / S. Sugama 2008. – Vol. 58, No 1. – P. 85 – 95.
16. *Watanabe T.* Is vascular endothelial cell growth factor (VEGF) involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy ? / T. Watanabe // Nephrology. – 2007. - Vol. 12. – P. S27-S27.
17. *Wasilewska A.* Glucocorticoid receptor and vascular endothelial growth factor in nephrotic syndrome / A. Wasilewska, W. Zoch-Zwierz // Acta Paediatrica. – 2006. – Vol. 95, Issue 5. - P. 587-593.
18. *Yang Y.* Transforming growth factor в pathways in inflammatory airway diseases / Y. Yang, N. Zhang, F. Lan [et al.] // Allergy. – 2014. – Vol. 69, N 6. – P. 699-707.

Надійшла до редакції 22.11.2016
Прийнята до друку 12.12.2016