

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені акад. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

**СИДОРЕНКО ЄВГЕНІЯ ВАЛЕНТИНІВНА**

УДК 612.017:616.61/.63-022-036.12

**ФАКТОРИ МІЖКЛІТИННОЇ КООПЕРАЦІЇ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ТА  
МОЖЛИВОСТІ ІМУНОКОРЕКЦІЇ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ  
ПІЄЛОНЕФРИТ**

14.03.08 – імунологія та алергологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

**КИЇВ – 2010**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДУ «Інститут нефрології АМН України»

**Науковий консультант -** доктор медичних наук, професор **Дріяньська Вікторія Євгенівна**, ДУ «Інститут нефрології АМН України», заступник директора з наукової роботи, завідувач лабораторії імунології

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор **Мельников Олег Феодосійович**, ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. І. Коломійченко АМН України», завідувач лабораторії патофізіології і імунології

доктор медичних наук, професор **Луньова Ганна Генадіївна**, Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика МОЗ України, завідувач кафедри клінічної лабораторної діагностики, м. Київ

Захист відбудеться 18.03.2010 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.003.02 в Національному медичному університеті ім. О. О. Богомольця МОЗ України (01023, м. Київ, вул. Шовковична, 39/1, Центральна міська лікарня, корпус 2).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця МОЗ України (03057, м. Київ, вул. Зоологічна, 1).

Автореферат розісланий 18.02. 2010 року.

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради,

доктор медичних наук, професор \_\_\_\_\_ С. Г. Свирид

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Хронічний пієлонефрит (ХрПН) – найпоширеніше захворювання нирок людини як в амбулаторній, так і в госпітальній практиці [Дядик О. І., Колесник М. О., 2003; Ребров Б. А., Строило Н. Г., 2007; Шифріс І. М., 2008; Ann E., 2006; Steven E., 2008]. Так, у 2007 р. в Україні захворюваність на хронічний пієлонефрит становила 156,3/100000, поширеність – 1559,4/100000 населення [Колесник М. О. та ін., 2008]. Рецидивуючий перебіг має місце у 30-50% пацієнтів, з них 10-25% мають хронічну ниркову недостатність (ХНН) [Колесник М. О., Степанова Н. М., 2007; Лапчинська І. І., 2006].

Актуальність проблеми зумовлена, насамперед, значною зміною за останні десятиріччя традиційного уявлення про етіологію та патогенез цього захворювання. Значно збільшилась кількість пацієнтів із латентним перебігом захворювання, надзвичайно складно досягти повної ремісії та вилікувати пацієнтів навіть з малосимптомними формами недуги.

Пієлонефрит та інфекції сечових шляхів - уретрит, цистит та безсимптомна бактеріурія - відносяться до інфекцій сечової системи (ІСС), які є різнорідними з точки зору як етіології, так і патогенезу, клінічних проявів і прогнозу.

Визначення патогенезу хронічних запальних захворювань нирок та сечових шляхів, особливо імунопатогенезу, є важливою проблемою [Михайлов І. В., 2006; Хворостов І. Н., 2008; Ethel S. et al., 2006; Grude N. et al., 2006; Rao M., 2007]. Доцільним є вивчення не тільки стану імунітету за даними стандартних досліджень, описаними рядом авторів [Макарова Т. П., 2000; Синюхин В. Н., Ковальчук Л. В., 2002; Tamaki K. et al., 2006], але і функціональної активності клітин та їх кооперативної взаємодії за результатами продукції цитокінів – інтерлейкінів, інтерферонів, факторів росту та експресії молекул адгезії, які регулюють розвиток місцевих захисних реакцій в тканинах за участю різних клітин крові, ендотелію, сполучної тканини та епітелію.

Особливості продукції цитокінів можуть впливати на такі важливі процеси, як апоптоз та міжклітинна адгезія. Тому представляє інтерес дослідження вивчення рецепторів контактної взаємодії, які складають 40% від усіх охарактеризованих поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин та відіграють важливу роль у презентації антигену та антигенспецифічній активації лімфоцитів, у хемотаксисі та фагоцитозі, міграції клітин [Егорова Н. И., 2003; Inamura H., 2004]. Інтерлейкіни та інтерферони грають важливу роль у регуляції апоптоза клітин імунної системи як в здорових, так і патологічних клітинах. Цитокіни можуть здійснювати проапоптотичні ефекти, пов'язані з поверхневим рецептором АРО-1/Fas (CD95+), який є маркером індукції апоптоза, а також антиапоптотичну дію через проведення сигналу за участю bcl-2 та пов'язаних з ним білків [Возианов А. Ф. и соавт., 2004; Тяжелова В. Г., 2003; Lin Y. et al., 2007]. Особлива практична важливість апоптоза

обумовлена існуванням патологічних станів, при яких клітини відрізняються підвищеною сприйнятливістю до сигналів, які індукують апоптоз, що викликає їх невинуватену загибель та ускладнює терапію [Іщейкін К. Є. та співавт., 2007; Мамонтова Т. В., Кайдашев І. П., 2007; Сепиашвили Р. И., 2002; Fadeel B., 2005; Klumpp D. J. et al. 2006].

Основною причиною незадовільних результатів якості діагностики та лікування ІСС є відсутність єдиних алгоритмів топічної діагностики на всіх етапах надання медичної допомоги. На сьогодні діагностика ІСС є обмеженою, в основному, клініко-лабораторними тестами, які не завжди дозволяють провести вірогідну топічну діагностику та/або визначити стан і ступінь ураження нирок [Hiraoka M. et al., 2005; Whiting P. et al., 2006], що призводить до невинуватеного антибактеріального лікування. Тому адекватна лікувальна тактика потребує, насамперед, визначення топічного діагнозу ІСС і, відповідно, актуальним є пошук критеріїв, що вдосконалюють діагностику (цистит/пієлонефрит).

При лікуванні пацієнтів на хронічні запальні сечостатеві захворювання надають перевагу використанню антибіотикотерапії, яка може мати свої негативні наслідки, крім того, не завжди ефективна при лікуванні хронічних процесів. Неефективність терапії хворих на ХрПН пов'язана, насамперед, з розвитком поліантибіотикорезистентності етіопатогенів, наявністю L-форм бактерій [Майданник В. Г., 2008; Степанова Н. М., 2007; Andreu A., 2005; Nicolle L., 2006], що призводить до хронізації запального процесу [Колесник М. О. та співавт., 2007; Паньків В. І., 2008; Holden N. J., 2006; Tamaki K., 2006]. В той же час, зараз імунологи мають позитивний досвід розробок та використання імуномодуляторів, які сприяють підвищенню ефективності лікування хворих, зниженню частоти рецидивів [Казько Н. И. и соавт., 2007; Сепиашвили Р. И., 2002; Чернушенко Е. Ф., 2001], хоча залишається проблемою недостатня інформативність щодо механізмів їх дії залежно від стану імунітету при різних патологіях [Бережная Н. М., 2006].

Українськими дослідниками розроблено ряд нових імуотропних препаратів, одним з яких є Протефлазід - препарат противірусної та імуномодулюючої дії рослинного походження вітчизняного виробництва, до складу якого входять флавоноїдні глікозиди, що утримуються в *Deschampsia caespitosa* L. і *Calamagrostis epigeios* L., які здатні блокувати ДНК-полімеразну активність в клітинах, інфікованих вірусами. Це призводить до зниження здатності або повній блокаді реплікації вірусної ДНК і, як наслідок, перешкоджає розмноженню вірусів. Одночасно Протефлазід збільшує продукцію ендогенних б- і γ-ІФ, що збільшує неспецифічну резистентність організму до вірусної та бактеріальної інфекції. Використання Протефлазиду продемонструвало його клінічні ефекти [Малевич М. П. и соавт., 2002; Ромашенко О. В. и соавт., 2002; Гурженко Ю. М., 2004], але визначались недостатньо механізми його впливу на цитокінову ланку імунітету та терапевтична дія в клініці нефрології. З іншого боку, важливим для ефективної терапії є визначення стану імунітету хворого та цілеспрямоване використання

препаратів, що здатні корегувати стан імунної системи, в тому числі фактори міжклітинної кооперації.

Таким чином, для ефективного лікування хронічного пієлонефриту необхідним є чіткий топічний діагноз, визначення особливостей імунопатогенезу, в тому числі його етіозалежних механізмів, і використання нових засобів імунотерапії. Для уявлення про ланки імунітету, які потребують корекції, доцільно охарактеризувати комплекс таких показників як стандартна імунограма і фактори міжклітинної кооперації - продукція цитокінів імунокомпетентними клітинами, їх активність в сечі та експресія на лімфоцитах рецепторів міжклітинної адгезії - intercellular cell adhesion molecules (ICAM-1) і проапоптотичних маркерів (CD95).

**Зв'язок роботи з науковими планами і програмами** – робота виконана в ДУ «Інститут нефрології АМН України» в рамках тем за планами МОЗ і АМН України: “Визначити етіозалежні механізми формування інфекцій сечової системи, їх топічну діагностику, лікування та профілактику” (№ держреєстрації 0104U000341); “Визначити *in vitro* вплив нових імунотропних препаратів на функціональну активність моноцитарно-макрофагальної ланки і Т-хелперів I, II типів та розробити на цій основі нові підходи до імунотерапії хворих на хронічні запальні захворювання сечостатевої системи” (№ держреєстрації 0104U002473); «Оптимізувати лікування хворих на інфекції сечової системи з рецидивуючим перебігом на основі вивчення їх етіологічних та імунологічних особливостей» (№ держреєстрації 0107U000277).

**Мета дослідження:** підвищення ефективності лікування хворих на хронічний пієлонефрит шляхом визначення деяких факторів міжклітинної кооперації (цитокінів та рецепторів) як складових імунопатогенезу, їх топічних і етіологічних особливостей та доцільності використання вітчизняного препарату Протефлазід.

#### ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ:

1. Визначити особливості стану імунної системи за даними стандартної імунограми у хворих на хронічний пієлонефрит..
2. Вивчити продукцію цитокінів клітинами моноцитарно-макрофагальною ланки (ІЛ-1,-6,-8, ФНП-б) та їх активність у сечі хворих на ХрПН, визначити особливості в залежності від етіологічних чинників.
3. Визначити особливості функціональної активності Т-хелперів 1, 2 і Т-регуляторних клітин за показниками рівнів, відповідно, г-ІФ, ІЛ-4 та ІЛ-10, ТФР-в, а також активність цитокінів у сечі пацієнтів з різним етіологічним спектром збудників пієлонефриту.
4. Оцінити стан рецепторів міжклітинної взаємодії за даними кількості клітин, що експресують молекули міжклітинної адгезії (ICAM-1), рецептори до г-ІФ (CD119), проапоптотичні маркери (CD95) у хворих в порівнянні із здоровими донорами.

5. Дослідити особливості рівня секреторних лейкоцитарних інгібіторів протеїназ – SLPI та встановити їх значення як додаткового маркера топічного діагнозу у хворих на інфекції сечової системи.

6. Визначити клініко-імунологічні ефекти Протефлазиду у хворих на хронічний пієлонефрит при використанні його в комплексній терапії.

**Об'єкт досліджень:** механізми імунопатогенезу хронічного пієлонефриту і тактика імунотерапії.

**Предмет досліджень:** фактори міжклітинної кооперації імунної системи - цитокіни (ІЛ-1, -6, -8, -4, -10, ФНП-б,  $\gamma$ -ІФ, ТФР-в); рецептори (рівень CD119+-, + CD-54+ та CD95+-клітин) у пацієнтів з ХрПН; вплив препарату Протефлазид на стан імунітету хворих.

**Методи досліджень:** лабораторні, мікробіологічні, імунологічні – імуноферментні, імунофлуоресцентні.

#### **Наукова новизна одержаних результатів:**

Дослідження стану функціональної активності клітин імунної системи хворих на хронічний пієлонефрит за даними спонтанної та індукованої продукції, рівня в сироватці та сечі лімфо- і монокінів дозволило визначити особливості цитокінової ланки його імунопатогенезу. Так, виявлені висока продукція прозапальних (ІЛ-1, -8, ФНП-б) та просклеротичного (ТФР-бета) цитокінів і зниження протизапального ІЛ-10, а також етіозалежні особливості – більш висока продукція прозапальних монокінів при наявності бактеріальної інфекції (*E.coli*, *Streptococcus Faec.*, *Staphylococcus*), асоціація високого рівню ІЛ-8 з наявністю *E.Coli*; особливості ІЛ-1, -10 та  $\gamma$ -ІФ у хворих з хламідійною інфекцією в порівнянні з іншими групами. Вперше визначені при ХрПН високий рівень клітин, які експресують рецептори до такого важливого лімфокіну як  $\gamma$ -ІФ (CD119+) і молекули міжклітинної адгезії ICAM-1 (CD-54+), що забезпечують міжклітинну кооперацію.

Особливості цитокінового профілю крові, високий рівень всіх визначених цитокінів в сечі, а також підвищення експресії адгезивних молекул (ICAM-1) у хворих на ХрПН свідчать про активацію клітин імунної системи. В той час як активація лімфоцитів і висока продукція ФНП-б на фоні хронічного запалення являються факторами ризику апоптозу, висока готовність до якого виявлена у хворих, підвищення в крові рівня протизапального цитокіну ТФР-в, який корелює з високою експресією CD95, може запобігати підвищеному апоптозу імунокомпетентних клітин.

Високий рівень ФНП-б та ІЛ-1 $\beta$  корелює з прогресуванням ХрПН і концентрація цих цитокінів збільшується відповідно зниженню функціонального стану нирок.

Вперше показано, що одним з маркерів пієлонефриту являються SLPI, високий рівень яких відмічений як в крові, так і в сечі, причому для гострого пієлонефриту

характерні більш високі показники в сироватці крові, а топічна діагностика хронічного пієлонефриту без ознак ураження сечового міхура може підтверджуватись більш низькими показниками в сечі в порівнянні з циститом.

#### **Практичне значення роботи:**

Стан імунітету у хворих з хронічним перебігом запалення нирок потребує вчасної імунокорекції для запобігання як ще більш загрозливим порушенням цитокінового профілю, які призводять до системних уражень, пов'язаних з порушенням компенсаторних можливостей клітин на фоні тривалої активації внаслідок персистенції збудників, так і апоптотичним проявам. Тому можна вважати науково-обґрунтованим необхідність застосування імуноотропних препаратів у хворих на ХрПН.

Дослідження факторів міжклітинної кооперації, а також аналіз особливостей залежно від етіологічних чинників хронічного запалення нирок дозволили визначити ланки, що потребують імунокорекції. Показано, що хворі з наявністю хламідій, діагностичного титру Ат до вірусів потребують стимуляції інтерферонової ланки імунітету, а пацієнти, що інфіковані *Strept. Faec.* – підвищення ІЛ-4-продукуючої здатності клітин.

Застосування Протефлазиду разом з традиційною антибактеріальною терапією у хворих на хронічний неускладнений пієлонефрит (в крові яких визначено діагностичне підвищення титрів антитіл (IgG) до *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus* та *Toxoplasma gondii*) сприяло більш вираженим клініко-імунологічним ефектам і динаміці біохімічних показників (зниженню в сироватці крові ТР та МДА). Отримані дані дозволили вважати доцільним і необхідним використання Протефлазиду у хворих на хронічний пієлонефрит та обґрунтувати підходи до його використання у нефрологічних хворих.

Запропонований спосіб топічної діагностики у хворих на хронічні інфекції сечової системи на основі визначення рівня SLPI в крові та сечі, який дозволяє виявити наявність циститу при більш високому рівні показників в сечі або пієлонефриту, на загострення якого вказують високі цифри в сироватці крові.

Результати роботи впроваджені в ДУ «Інститут урології АМН України», «Інститут нефрології АМН України», Київському міському науково-практичному центрі нефрології та гемодіалізу, кафедрі клінічної імунології та алергології НМУ ім. О.О.Богомольця; розроблений «Спосіб лікування хворих на хронічний пієлонефрит» (Патент України № 22359).

**Особистий внесок здобувача:** Матеріали, представлені в роботі, є особистим внеском автора у вирішення проблеми визначення механізмів імунопатогенезу хронічного пієлонефриту та впливу Протефлазиду на клінічний стан та імунну систему хворих. Ідеї дисертаційної роботи запропоновані науковим керівником заступником директора з наукової роботи, завідувачем лабораторії імунології ДУ «Інститут нефрології АМН України» доктором медичних наук, професором Дріянською В.Є. Сидоренко Є.В. самостійно проведений патентно-інформаційний

пошук та аналіз літературних даних. Самостійно проводилась робота з матеріалами дослідження та лабораторне тестування рівнів цитокінів та SLPI в крові та сечі. Дослідження стандартних показників імунітету, мікробіологічні та біохімічні дослідження проведені спільно з фахівцями відповідного профілю – спеціалістами лабораторій імунології, мікробіології і біохімії ДУ «Інститут нефрології АМН України». Дисертант приймала участь в клінічному спостереженні за хворими в динаміці лікування, в тому числі з використанням Протефлазиду. Самостійно проведений статистичний аналіз, надана оцінка отриманим результатам і написана дисертаційна робота.

**Апробація результатів роботи:** на VII Міждисциплінарній науково-практичній конференції "Епідеміологія, імунопатогенез, діагностика, лікування хламідіозу та TORCH-інфекцій", 20-21 грудня 2006 р., Київ; IX Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації. 25-26 квітня 2007 р., Київ; II Національному конгресі з клінічної імунології, 19-20 листопада 2007, Миргород; X Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації, 22-23 квітня 2008 р., Київ; VIII міждисциплінарній науково-практичній конференції "Епідеміологія, імунопатогенез, діагностика, лікування хламідіозу та TORCH-інфекцій", 25-26 листопада 2008 р., м. Київ; Міжнародній науково-практичній конференції «Імунотерапія, імунопрофілактика в клінічній практиці: реалії та перспективи» (осінні читання), 14-16 жовтня, 2009 р., м. Львів.

Робота обговорена на об'єднаному засіданні Вченої ради ДУ «Інститут нефрології АМН України», лабораторій імунології, мікробіології та біохімії ДУ «Інститут урології АМН України» і кафедри клінічної імунології та алергології з курсом дитячої імунології Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця 19 січня 2009 року.

**Публікації:** За матеріалами дисертації надруковано 13 наукових праць, серед них 9 статей у фахових виданнях, рекомендованих ВАК України, 3 тези доповідей, 1 деклараційний патент.

**Структура та обсяг дисертації:** Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення, висновків, списку літератури.

Дисертація викладена на 152 листках машинописного тексту.

До списку літератури входить 443 джерела літератури, з них 202 вітчизняних і 241 іноземних. Дисертація ілюстрована 13 таблицями та 26 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Вивчався стан імунітету у 173 хворих на хронічні інфекції сечової системи (163 пацієнти з хронічним пієлонефритом, 10 –



хронічним циститом), які обстежувались та лікувались в ДУ «Інститут нефрології АМН України» (директор – д.мед.н., професор М.О.Колесник).

Серед пацієнтів було 85% жінок, які знаходились на амбулаторному та/або стаціонарному лікуванні на протязі 2005-2008 рр., вік хворих від 20 до 52 років (у середньому  $33,5 \pm 2,4$ ). При порівнянні груп з використанням критерію  $\chi^2$ -квадрат групи не відрізнялись за ознаками віку ( $p > 0,05$ ).

Комісією з біоетики ДУ «Інститут нефрології АМН України» (протокол № 6 від 04.12.08р.) встановлено, що обстеження, лікування хворих, проведення лабораторних та наукових досліджень в дисертаційній роботі відповідають вимогам норм біоетики.

Нозологічна діагностика хронічного пієлонефриту базувалась на оцінці даних анамнезу, клініко-лабораторних проявів захворювання та результатів ультразвукового дослідження нирок. Критеріями включення пацієнтів до дослідження були: наявність клінічних ознак захворювання (дизурія, часте сечовипускання, підвищення температури тіла, відчуття болю та важкості у крестово-поясному куті та інші), лейкоцитурія, бактеріурія та виявлення факторів, що сприяють формуванню інфекційного процесу в сечовій системі.

Усім хворим проводилось загальноклінічне (розпитування, фізикальне обстеження), клінічне лабораторне (аналізи крові та сечі), біохімічне (рівні загального білка і його фракцій, креатиніну, сечовини, неорганічних електролітів, білірубіну, АлаТ, АсаТ крові) та ультразвукове дослідження органів черевної порожнини. Окрім того, вивчали рівень  $v_2$ -мікроглобулінурії та добової протеїнурії, підраховували швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ).

Для визначення гематологічних та біохімічних показників крові використовували аналізатори «ABX Micros-60» (Франція) та «Flexor junior» (Нідерланди). Рівні лейкоцитурії та еритроцитурії визначали за допомогою кількісного підрахунку клітин у полі зору за стандартними методами [Меньшиков В. В., 1987].

Мікробіологічні дослідження були проведені в лабораторії мікробіології, вірусології та мікології ДУ «Інститут урології АМН України» (зав. лаб. д. б. н., професор А. В. Руденко). Досліджувались зразки різного патологічного матеріалу - зішкряби із слизової уретри, цервікального каналу, піхви, а також сеча пацієнтів, які звернулися з приводу запальних захворювань сечової системи.

Обстеження включало визначення в біологічному матеріалі (зішкрябів зі слизових оболонок цервікального каналу, уретри, піхви та сечі) бактерій, грибів та молікутів. Кількісне визначення бактерій та грибів проводили шляхом посіву матеріалу на тверді поживні середовища – кров'яний агар та агар Сабуро за Родманом. Ідентифікацію виявлених бактерій проводили за Bergey's. Чутливість бактерій до антибіотиків визначали методом стандартних дисків [Биргер М. О., 1982].

Крім того, в зішкрябах зі слизових оболонок уретри та цервікального каналу досліджували наявність хламідій ампліфикаційним методом в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) з використанням праймерів та обладнання виробництва фірм “ДНК-технологія” та “Амплісенс” (Росія). Молекути (*M. hominis* та *U. urealyticum*) виділяли, користуючись тест-системами *Mycoplasma*-DUO [Биргер М. О., 1982]. У сироватці крові за допомогою ІФА визначали рівні специфічних імуноглобулінів до *Herpes simplex virus* (ВПГ), *Cytomegalovirus* (ЦМВ), *Toxoplasma gondii* (Т.) та *Chlamydia trachomatis* (*C. trach.*) [Биргер М. О., 1982]. Нормальні значення титрів антитіл (Ig G) визначали як: ВПГ <1:100, ЦМВ <1:400, *C. trach.* <1:40 та Т. <1:10. В роботі використовували тест-системи виробництва “Orgenics” (Ізраїль) та “Вектор-Бест” (Росія).

Дослідження стандартних показників імунітету проводили у 173 хворих в порівнянні з 63 здоровими донорами. Визначали відносну та абсолютну кількість лімфоцитів, що мали поверхневі антигени з кластерами диференцировки CD3, CD4, CD8, CD22, з використанням розеточного тесту та набору діагностикумів на основі моноклональних антитіл (Вітебськ, Білорусь). Вміст імуноглобулінів класів А, G, М визначали методом радіальної імунодифузії за Mancini G. Вміст імуних комплексів (ІК) в сироватці визначали за допомогою методу преципітації поліетиленгліколем; кількість фагоцитуючих клітин та їх поглинаючу активність визначали за їх здатністю поглинати частинки латексу.

Число клітин з рецепторами до г-ІФ (CD119+) визначали у 25, а ICAM (CD54+), про-апоптотичні маркери (CD95+-клітини) - у 37 хворих, контрольна група - 20 здорових донорів. Ці дослідження виконані з використанням флуоресціюючих моноклональних антитіл („Медбіоспектр”, “Сорбент”, Росія; “Coltage” (США) та люмінесцентної мікроскопії.

У 35 хворих з хронічним пієлонефритом та 10 - циститом за допомогою імуноферментного аналізу (STAT-Fax 303 Plus) визначали особливості цитокін-продукуючої активності імунокомпетентних клітин (спонтанна/індукована), а також рівня в крові та сечі цих медіаторів (ІЛ-1, -4, -6, -8 -10, ФНП-б, г-ІФ, ТФР-в) і SLPI; в сироватці крові - рівнів Ат до ЕТ, ІgЕ. Контрольну групу склали 25 здорових мешканців Києва.

Використовували тест-системи «Протеиновый контур» (Росія), «Diaclone» (Франція) і DRG (Німеччина) для визначення цитокінів; “Nucult biotechnology” Human SLPI (Нідерланди) - SLPI; тест-системи «ООО Укрмедсервіс» (Донецьк, Україна) - Ат до ЕТ та загального ІgЕ.

Проведений аналіз клініко-мікробіологічних ефектів препарату Протефлазід у 60 пацієнтів з пієлонефритом в порівнянні з 90 хворих, що лікувалися стандартними методами антибіотикотерапії. Показанням до призначення Протефлазиду була наявність діагностично-значущих рівнів специфічних антитіл Ig G до *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus*, *Toxoplasma* та/або *Chlamydia trachomatis* та рецидивуючий перебіг захворювання. Дослідження імунної системи в динаміці за даними

стандартної імунограми, продукції цитокінів, SLPI, Ат до ЕТ, IgE, стану антиоксидантної ферментемії та активності процесів пероксидації проводили у 45 жінок, хворих на хронічний неускладнений пієлонефрит. В 1 групу (контрольну) включили 20 жінок, які отримували антибактеріальну терапію відповідно результатам бактеріального посіву сечі (фторхінолони, цефалоспорини, сульфаніламід, аміноглікозиди), в 2 групу (дослідну) увійшли 25 хворих, які додатково до такої терапії отримували Протефлазід.

Отримані дані оброблені статистично на персональному комп'ютері за допомогою пакета програм "SPSS for Windows. Версія 11" та "MedStat". Математична обробка одержаних результатів проводилася з урахуванням перевірки показників на нормальний розподіл та порівняння груп за ознаками статі та віку з використанням критерію хі-квадрат [Лях Ю. Є., Гурьянов В. Г., 2004]. Для статистичної обробки використовувались параметричні критерії статистики - тест Ст'юдента і метод Шеффе або непараметричні – критерій Уїлкоксона, аналіз Крускала-Уолліса. Оцінювали середні показники (M), їх похибки (m), коефіцієнт кореляції (r) та достовірність середніх показників (p). Достовірною вважали різницю при  $p < 0,05$ .

**Отримані результати та їх обговорення.** За даними стандартної імунограми, у хворих на ХрПН виявлено достовірне зниження відносного та абсолютного рівня CD4+-клітин, співвідношення CD4+/CD8+-лімфоцитів, більш виражене у пацієнтів з хронічним ускладненим пієлонефритом, та підвищення відносної кількості CD22+-лімфоцитів, IgM та ІК.

Дослідження показали достовірне підвищення у пацієнтів спонтанної та індукованої продукції, а також рівня в крові ІЛ-1 ( $124,4 \pm 4,1$  в порівнянні з  $94,8 \pm 2,8$  пг/мл), ІЛ-8 ( $38,8 \pm 2,8$  в порівнянні з  $10,2 \pm 0,8$  пг/мл), ФНП-б ( $60,8 \pm 4,7$  в порівнянні з  $24,1 \pm 1,6$  пг/мл) ( $p < 0,05$ ), а в сечі вони перевищували показники здорових від 20 (ІЛ-1) до 80 (ІЛ-6) разів ( $p < 0,001$ ). В той же час, рівень ІЛ-6 в сироватці крові не відрізнявся від норми ( $51,0 \pm 2,8$  та  $51,9 \pm 2,1$  пг/мл) ( $p > 0,05$ ), що може характеризувати здатність епітеліоцитів при взаємодії з уропатогенними штамми продукувати прозапальні цитокіни.

Показано, що високий рівень прозапальних цитокінів ІЛ-1 та ФНП-б має зворотній зв'язок із швидкістю клубочкової фільтрації та погіршенням функції нирок, що вказує на їх роль в патогенезі та формуванні хронічної ниркової недостатності як ускладнення пієлонефриту.

Дослідження продукції г-ІФ виявили, що спонтанна ( $25,1 \pm 1,4$  пг/мл) не відрізняється від норми ( $26,0 \pm 0,9$  пг/мл), тоді як мітоген-індукована достовірно знижена – відповідно,  $40,7 \pm 3,7$  та  $67,4 \pm 6,0$  пг/мл ( $p < 0,01$ ); рівень в сечі був високим. Відносний рівень клітин, що експресують рецептори до г-ІФ (СД 119+), достовірно вище норми ( $34,07 \pm 0,80\%$  та  $13,87 \pm 0,77\%$ ,  $p < 0,001$ ).

Визначення цитокінів, що продукуються, в основному, Т-хелперами 2 та Т-регуляторними клітинами, показало високі показники як продукції, так і рівнів в

сироватці ІЛ-4 ( $83,94 \pm 2,3$  та  $16,11 \pm 0,74$  пг/мл) і ТФР-в ( $92,7 \pm 5,4$  та  $56,6 \pm 4,3$  пг/мл), рівень ІЛ-10 був знижений ( $11,1 \pm 0,6$  в порівнянні з  $19,9 \pm 2,7$  пг/мл). Продемонстровано високий рівень цих цитокінів в сечі – перевищення в 10 (ТФР-в) та 4 (ІЛ-4) рази, що можна використовувати для неінвазивного обстеження з метою додаткового уявлення про ступінь запалення під час діагностики та спостереження за динамікою його перебігу в процесі лікування.

Особливий інтерес мають дослідження ТФР-в - поліфункціонального цитокіну, який бере участь у регуляції процесів проліферації, диференціації, міграції та апоптозу. Отримані нами дані дозволяють вважати високу активність клітин по продукції ТФР-в у хворих на ХрПН негативним фактором, що може призводити до пригнічення імунної відповіді. Крім того, він може бути чинником проліферації сполученої тканини та фіброзу нирок, ушкоджених запальним процесом, а це може погіршувати їх функціонування та прискорювати розвиток хронічної ниркової недостатності.

Цитокіни впливають на процес запалення і місцеву деструктивну реакцію, і важливу роль при цьому грають механізми міжклітинної кооперації, які забезпечують, в тому числі, молекули адгезії. Дослідження показали, що у хворих на ХрПН експресія ICAM в 1,7 рази перевищує норму ( $27,35 \pm 1,31$  проти  $16,78 \pm 0,85\%$ ,  $p < 0,001$ ), що свідчить про активацію клітин імунної системи та готовність здійснювати міжклітинну кооперацію. З іншого боку, тривалий активований стан клітин, виражений в тому числі, високою експресією та, відповідно, концентрацією в сироватці ICAM-1, несе в собі загрозу розвитку різних ускладнень, пов'язаних як із порушенням компенсаторних можливостей клітин, так і з більш системними ураженнями.

Представляють інтерес отримані дані щодо високого рівня у пацієнтів лімфоцитів, які експресують проапоптотичні маркери CD95 -  $28,27 \pm 1,42$  проти  $11,1 \pm 1,07\%$  у здорових ( $p < 0,001$ ). Тобто, продемонстровано високий рівень готовності клітин до апоптозу у хворих з ХрПН на тлі підвищення продукції клітинами *in vitro* і високого рівня в крові таких цитокінів як ФНП-б і ТФР-в. Вважаємо, що в той час як активація лімфоцитів і висока продукція ФНП-б на фоні хронічного запалення являються факторами ризику апоптозу, високий рівень в сироватці крові протизапального цитокіну ТФР-в, що корелює з експресією CD95, може запобігати підвищеному апоптозу імунокомпетентних клітин. Не можна виключити, що і підвищення експресії адгезивних молекул (ICAM-1) у хворих може здійснювати антиапоптотичну дію [Потапнев М. П., 2002].

Незважаючи на численні тривалі дослідження хворих на ІСС, до останнього часу не встановлено єдиного підходу до діагностичної тактики. Останнім часом збільшилась у 2,5 рази кількість латентного перебігу хвороби та стало надзвичайно складно як виявити хронічну інфекцію, так і діагностувати – чи це запальний процес сечового міхура (цистит), або клініко-лабораторні дані ураження нирок без циститу (пієлонефрит), у ряді випадків мають місце обидва процеси. При наявності

насьогодні великої кількості сучасних антибактеріальних препаратів залишається проблема лікування хворих на хронічний цистит (ХЦ) та ХрПН, і від правильного топічного діагнозу залежать особливості лікувальної тактики і, відповідно, ефективність терапії. Тому розмежування інфекції сечовивідних шляхів та нирок є необхідним елементом діагностики, і пошук додаткових маркерів для діагностики є актуальним.

Порівняння показників стандартного імунітету у хворих на хронічний пієлонефрит і цистит виявило, що, на відміну від хворих з циститом, при пієлонефриті достовірно знижений рівень CD4<sup>+</sup>- та підвищений - CD22<sup>+</sup>-лімфоцитів і ІК. Привернули увагу показники рівня ФНП-б у хворих на хронічний цистит, які були майже вдвічі вищими, ніж у хворих з наявністю хронічного рецидивуючого пієлонефриту – відповідно, 99,6±6,1 та 43,5±3,0 пг/мл в крові і 4,2±1,4 та 1,6±0,56 в сечі (p<0,001), інші показники рівнів цитокінів в крові та сечі, хоча і відрізнялися від норми, але не мали достовірної різниці при порівнянні груп.

Для нашого уявлення про як імунопатогенез сечових інфекцій, так і особливості у разі різної топіки запального процесу (нирки/сечовий міхур) досліджували в сироватці крові та сечі рівні секреторних лейкоцитарних інгібіторів протеїназ (SLPI) у 40 хворих з ICC, контрольну групу складала 10 здорових донорів. Виявлено підвищення рівня SLPI у хворих на запальні захворювання сечової системи в порівнянні з нормою – середні показники в сироватці підвищувались в 2 рази, а в сечі в 5 разів відносно норми.

Аналізували показники при порівнянні 3 груп (гр.): 1 гр. – 20 пацієнтів з хронічним пієлонефритом, 2 гр. – 10 з хронічним циститом, 3 гр. – 10 з клініко-лабораторними ознаками гострого пієлонефриту (або загострення ХрПН). При загостренні пієлонефриту виявлено найбільш високий рівень SLPI в крові (3223±410 пг/мл), який достовірно відрізнявся від норми (1181±76 пг/мл) (p<0,001) і показників у пацієнтів інших груп.

При наявності хронічного циститу рівень SLPI в крові (2052±316 пг/мл) не відрізнявся від групи з хронічним пієлонефритом (2240±178 пг/мл) (p>0,05), однак, у цих хворих відмічений їх найбільший рівень в сечі (4171±225 в порівнянні з 1857±203 пг/мл) (P<0,05). Індивідуальний аналіз підтвердив, що топічну діагностику при хронічних інфекціях сечової системи можна підтверджувати, при наявності інших клініко-лабораторних даних, високим рівнем SLPI в сечі (>3200 пг/мл) при циститах та високими показниками в сироватці крові (>4000 пг/мл) при загостренні хронічного пієлонефриту.

При мікробіологічному дослідженні хворих на хронічний пієлонефрит виявлені бактерії та молікути різних груп, і для уявлення про можливу кореляцію між характеристикою збудників запального процесу та станом імунітету проведений аналіз показників в різних групах. До таких досліджень спонукали деякі публікації про підвищення рівнів деяких цитокінів (ІЛ-1, -4, г-ІФ) у здорових донорів, якщо

вони були безсимптомними носіями умовно-патогенної та патогенної мікрофлори [Кузнецов В. Ф., 2003; Рябичева Т. Г., 2005].

Для аналізу пацієнти були поділені на 6 груп залежно від етіологічних чинників, і виявлені деякі особливості імунітету: у пацієнтів з ХрПН, в сечі яких виявляли діагностично значущу кількість *E. coli*, на відміну від інших груп, не було змін рівня CD22+-клітин та ІК, а продукція ІЛ-8 ( $47,20 \pm 4,18$  в порівнянні з  $10,25 \pm 0,75$  пг/мл в нормі,  $p < 0,001$ ) та рівень його в сечі ( $8,6 \pm 0,25$  та  $0,23 \pm 0,01$  пг/мл) були найбільш високими; співвідношення CD4/CD8 достовірно нижче, ніж у здорових донорів ( $1,66 \pm 0,05$ ) та хворих з іншими збудниками, при наявності уреазоплазми ( $1,30 \pm 0,03$ ) та *St. Faecalis* ( $1,22 \pm 0,06$ ) ( $p < 0,05$ ). Рівень ІЛ-6 в сечі, а також продукція ІЛ-1 клітинами у хворих на ХрПН з діагностичним рівнем Ат до ЦМВ та ВПГ ( $40,07 \pm 4,00$  пг/мл), уреазоплазмозом та хламідіозом ( $45,12 \pm 2,90$ ) нижче, ніж при наявності бактеріальної інфекції *E. coli* ( $60,08 \pm 5,52$  пг/мл), *Strept Faec.* ( $67,72 \pm 7,20$  пг/мл) ( $p < 0,05$ ). Звертає увагу найменш виражене підвищення рівню ІЛ-4 в сечі у хворих з наявністю *St. Faecalis* ( $3,47 \pm 0,79$  пг/мл).

У хворих на ХрПН з наявністю інфікування хламідіями відмічено зниження спонтанної ( $15,90 \pm 0,90$  в порівнянні з  $26,06 \pm 0,9$  пг/мл) та індукованої ( $24,00 \pm 2,0$  в порівнянні з  $67,44 \pm 6,0$  пг/мл) продукції  $\gamma$ -ІФ, найбільш низький його рівень в сечі серед усіх 6 груп у хворих з наявністю в крові Ат до вірусів (ЦМВ, ВПГ). Тобто, хворі на ХрПН з наявністю хламідій, діагностичного титру Ат до ЦМВ, ВПГ потребують стимуляції інтерференової ланки, а результати щодо кількості лімфоцитів з рецепторами до  $\gamma$ -ІФ (СД119+) дозволяють передбачати, що імунна система у хворих спроможна відповідати на нього.

**Визначали клініко-мікробіологічні (60 хворих) та імунологічні (25 хворих) ефекти Протефлазиду** (контрольні групи, відповідно, 90 та 20 пацієнтів) у хворих на хронічний неускладнений пієлонефрит, в крові яких виявлено діагностичне підвищення титрів антитіл (IgG) до *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus*, *Toxoplasma gondii* та/або *Chlamydia trachomatis*. Пацієнти на фоні антибактеріальної терапії (фторхінолони, цефалоспорини, сульфаніламід, аміноглікозиди, один з яких використовували згідно до встановленої чутливості виявлених збудників) (1 гр) додатково внутрішньо застосовували Протефлазид (2 гр) 3 рази на день у дозі на 1-й тиждень лікування по 5 крапель, на 2 – 3-й – по 10 крапель, на 4-й – по 8 крапель, що призводило до позитивної динаміки клінічного стану і функціональної активності імунокомпетентних клітин по продукції медіаторів і стану антиоксидантної системи організму.

Так, клінічне обстеження продемонструвало, що після курсу лікування хворі на ХрПН досліджуваної групи скарг на дизурію, ніктурію та часте сечовипускання не мали на відміну від контрольної групи, в якій у 20% жінок ці скарги зберігалися. Впродовж року у 30% хворих контрольної групи був рецидив захворювання, а у жінок, що отримували Протефлазид – у 16% ( $p < 0,05$ ). У загальноприйнятих аналізах сечі та крові різниці між групами не встановлено.

Аналіз частоти ерадикації класичних бактерій, *S. trachomatis* та молюкутів встановив достовірну ефективність лікування в обох групах хворих ( $p < 0,001$  для всіх збудників). Проте після етіотропного лікування з використанням Протефлазиду ерадикацію мікроорганізмів як в сечі, так і в зішкрябах з уретри та цервікального каналу досягнуто у всіх хворих, тоді як в групі порівняння *U. urealyticum* не вдалося видалити у 10% жінок ( $p = 0,04$ ). Частота визначення діагностично-значущих титрів Ig G до Herpes simplex virus мала тенденцію до зменшення в обох групах жінок, але у хворих основної групи частота визначення була достовірно меншою ( $p < 0,05$ ). Тобто використання Протефлазиду сприяло елімінації Herpes simplex virus та *U. urealyticum*.

Клінічне одужання супроводжувалось достовірним зниженням рівня ЕТ в крові від  $0,054 \pm 0,005$  до  $0,038 \pm 0,002$  пг/мл ( $p < 0,05$ ) (хоча показники і не досягли норми  $0,028 \pm 0,001$  од.опт.щ.,  $p < 0,05$ ), що може вказувати на ерадикацію збудників процесу та зниження інтоксикації.

Дослідження цитокинової ланки показали, що підвищена більш ніж в 3 рази продукція ІЛ-8 після лікування достовірно знижалася в групі хворих, що приймали Протефлазид, від  $38 \pm 2,3$  до  $28,8 \pm 3,1$  пкг/мл ( $p < 0,05$ ); рівень в сечі зменшився в 2 рази ( $p < 0,05$ ), в групі порівняння достовірних відмінностей не встановлено. Після терапії відбувалося зниження в обох групах хворих спонтанної продукції г-ІФ, яке ми розцінюємо як наслідок впливу антибіотикотерапії, але використання Протефлазиду сприяло меншому зниженню продукції цього противірусного цитокіну, що є позитивним ефектом. Важливим ефектом Протефлазиду можна вважати більш низький після терапії рівень цього лімфокіну ( $2,01 \pm 0,14$ ) в сечі, в порівнянні з контрольною групою ( $3,8 \pm 0,4$  пг/мл,  $p < 0,05$ ), що вказує на нормалізацію процесу запалення в сечовій системі.

Лікування за допомогою Протефлазиду сприяло зниженню продукції ТФР-в від  $36,8 \pm 2,6$  до  $27,2 \pm 2,2$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), тоді як в контрольній групі не відбувалось достовірних змін і продукція цього ростового фактору залишалась високою -  $35,0 \pm 1,2$  пг/мл ( $p > 0,05$ ).

Дослідження SLPI не виявили достовірної динаміки як після традиційної терапії, так і відразу після використання Протефлазиду, але через 1 рік після лікування рівень SLPI в крові пацієнтів, що приймали Протефлазид, достовірно знижався і не відрізнявся від норми ( $1260 \pm 101$  в порівнянні з  $1122 \pm 76$  пг/мл,  $p > 0,05$ ).

Застосування Протефлазиду позитивно впливало і на системи перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту - сприяло нормалізації показників вмісту трансферину (у 66% хворих) та малонового діальдегіду (у 70% хворих) в сироватці крові ( $p < 0,05$ ). Показник вмісту церулоплазміну змінювався позитивно у 50% хворих.

Таким чином, доповнення антибактеріальної терапії препаратом Протефлазид призводить до позитивних клініко-імунологічних ефектів з нормалізацією факторів



міжклітинної кооперації імунної системи та більш ефективної ерадикації бактеріальних та вірусних збудників.

Отримані результати дозволили визначити особливості важливих факторів міжклітинної взаємодії імунної системи у хворих на хронічний пієлонефрит, а також вважати використання Протефлазиду в комплексній схемі антибіотикотерапії доцільним та необхідним для покращення результатів лікування, запобігання рецидивуванню та подальшому прогресуванню запального процесу і нефросклерозу.

## ВИСНОВКИ

У дисертації представлено теоретичне узагальнення та практичне вирішення актуального для медицини, зокрема, імунології, розкриття механізмів етіопатогенезу хронічного пієлонефриту на основі вивчення клітинного, гуморального імунітету і факторів міжклітинної кооперації імунної системи та визначення клініко-імунологічних ефектів Протефлазиду у пацієнтів.

1. У хворих на хронічний пієлонефрит (ХрПН) спостерігається зниження рівня Т-хелперів/індукторів (CD4+), CD4+/CD8+, підвищення рівня В-лімфоцитів (CD22+), а також імунних комплексів і імуноглобуліну М в сироватці крові; аналіз імунограм залежно від спектру збудників захворювання показав, що у пацієнтів з *E.coli* (моно або мікст зі *St. faecalis*), не було змін рівня CD22+-клітин та ІК, нормальним останній показник був також у хворих з *U. Urealyticum*.
2. У хворих на ХрПН виявлено підвищення спонтанної та індукованої продукції, рівня в сироватці крові і сечі пацієнтів прозапальних цитокінів ІЛ-1, -8, ФНП-б. У хворих на вірусну інфекцію (діагностичний рівень Ат до ЦМВ та ВПГ), уреоплазмоз та хламідіоз активність клітин по продукції ІЛ-1 та рівень ІЛ-6 в сечі нижче, ніж при наявності бактеріальної інфекції (*E. coli*, *St. Faecalis*). Максимальною є активність клітин по продукції ІЛ-8 та рівень його в сечі у хворих з наявністю *E. coli* як моно- або мікст-інфекції.
3. Спонтанна продукція прозапального г-ІФ у хворих на ХрПН не відрізняється від норми, але мітоген-індукована нижче, ніж у здорових донорів, рівень в сироватці та сечі достовірно перевищує норму; найбільш низька продукція г-ІФ у випадках наявності *Ch. trachomatis*, а рівень в сечі - у хворих, які мають в крові Ат до *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus* та *Toxoplasma gondii*, що свідчить про доцільність корекції інтерференової ланки при діагностуванні хламідійної інфекції і Ат до вірусів, а високий рівень лімфоцитів з рецепторами до г-ІФ (CD119+) дозволяє вважати імунну систему пацієнтів спроможною на відповідь.
4. У хворих виявлено підвищення продукції протизапальних цитокінів ІЛ-4, ТФР-в, їх рівнів в сироватці та сечі, а також ІЛ-10 в сечі; дослідження етіологічних особливостей показало найбільш низьку, в порівнянні з іншими групами, продукцію ІЛ-4 у хворих з наявністю *St. Faecalis* в сечі, достовірної різниці між іншими показниками не було.



5. Виявлена висока готовність клітин пацієнтів з ХрПН до апоптозу, за даними кількості CD95+-лімфоцитів, на фоні підвищення експресії молекул адгезії – числа CD54+-лімфоцитів, а також високого рівню ТФР-в, які можуть здійснювати антиапоптотичну дію.
6. Не виявлено різниці між хронічним пієлонефритом та циститом за показниками цитокинової ланки та рівнів Ат до ЕТ, ІgЕ (за винятком більш високого рівню ФНП-б при циститах). Дослідження SLPI, рівень яких в крові та сечі при ХрПН достовірно вище за норму, дозволяють підвищення в сироватці >4000 пг/мл вважати додатковим маркером діагностики гострого/загострення хронічного пієлонефриту, а високий показник в сечі (>3200 пг/мл) - циститу.
7. Використання Протефлазиду на фоні антибіотикотерапії у хворих на ХрПН призводило до зниження продукції ІЛ-8, ТФР-в, рівнів Ат до ЕТ в крові і прозапальних цитокінів ІЛ-8 та г-ІФ в сечі, позитивному впливу на ПОЛ-АОЗ (МДА та ТР); нормальна до того продукція г-ІФ (25,1±1,4 пг/мл) після лікування знижувалась, але в досліджуваній групі цей показник був достовірно вище, ніж в контрольній (18,1±0,6 та 14,4±1,5 пг/мл, p=0,02).
8. Дослідження SLPI не виявили достовірної динаміки після як традиційної терапії, так при використанні Протефлазиду, але через 1 рік після лікування рівень SLPI в крові пацієнтів другої групи достовірно знижувався і не відрізнявся від норми (1260±101 в порівнянні з 1122±76 пг/мл, p>0,05).
9. Особливості етіопатогенезу хронічного пієлонефриту, клініко-мікробіологічні та імунологічні ефекти Протефлазиду дозволяють вважати доцільним його використання у хворих на ХрПН, особливо у разі діагностичного підвищення титрів антитіл до Herpes simplex virus, Cytomegalovirus, C. trachomatis або Toxoplasma gondii, що забезпечує зменшення частоти рецидивів та попереджує погіршення функції нирок.

### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Дослідження секреторних інгібіторів лейкоцитарних протеаз в крові та сечі як маркерів запалення є доцільним для діагностики наявності інфекцій сечової системи і підтвердження топічного діагнозу - підвищення рівня SLPI в сироватці крові до 4000 пг/мл і більше асоціює з гострим чи загостренням хронічного пієлонефриту, а в сечі вище 3200 пг/мл - з циститом.
2. Хворим на хронічний неускладнений пієлонефрит, особливо у разі наявності U. Urealyticum, C. trachomatis та діагностичного підвищення в крові титрів антитіл (ІgG) до вірусів (Herpes simplex virus, Cytomegalovirus або Toxoplasma gondii), рекомендується додатково до антибактеріальної терапії призначати Протефлазид за наступною схемою: 1-й тиждень по 5 крапель (0,2 мл), на 2-3-й – по 10 крапель (0,4 мл), на 4-й – по 8 крапель (0,3 мл) тричі на день, що призводить до більш швидкого покращення стану хворих та ефективної елімінації збудників, зниженню числа рецидивів протягом 1-3 років.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Степанова Н. М. Продукція цитокінів у хворих на хронічний пієлонефрит, в комплексній терапії яких використовували протезфлазид / Н. М. Степанова, В. Є. Дріянська, А. В. Руденко, Є. В. Сидоренко, Г. М. Драннік // Імунологія та алергологія. – 2006. - № 4. – С. 48-50. (Автором проведений відбір хворих для обстеження, визначення продукції цитокінів, аналіз динаміки показників).
2. Дріянська В. Є. Стан імунітету у хворих на хронічні інфекції сечової системи / В. Є. Дріянська, Г. Г. Драннік, Н. М. Степанова, Н. А. Калініна, Є. В. Сидоренко, О. П. Петрина, О. Д. Нікітін // Український журнал нефрології та діалізу. – 2007. - № 2 (14). – С. 13-18. (Проведений аналіз імунограм та надана характеристика особливостей імунітету у хворих на хронічний пієлонефрит).
3. Дріянська В. Є. Рівень CD95+-клітин та особливості продукції ФНП-б і ТФР-в у хворих на хронічний пієлонефрит / В. Є. Дріянська, Є. В. Сидоренко, Н. М. Степанова, Г. Г. Драннік, В. Й. Фесенкова, Н. А. Калініна, Г. М. Драннік / Імунологія та алергологія. – 2007. - № 3. – С. 56-59. (Визначена продукція цитокінів, проведений аналіз їх особливостей та кореляцій, написана стаття).
4. Сидоренко Є. В. Вплив протезфлазиду на продукцію цитокінів та систему ПОЛ-АОЗ у хворих на хронічний пієлонефрит / Є. В. Сидоренко, В. Є. Дріянська, Н. М. Степанова, А. В. Руденко, В. Т. Кругліков, Л. Я. Мігаль, Л. В. Король, Г. Г. Нікуліна, О. В. Стребкова, Г. М. Драннік // Сімейна медицина. – 2007. - № 4. – С. 29-33. (Проведений аналіз динаміки цитокінів під впливом терапії у пацієнтів, написана частина статті).
5. Драннік Г. М. Гетерогенність імунних порушень при хронічних запальних захворюваннях нирок та можливості цілеспрямованої корекції / Г. М. Драннік, В. Є. Дріянська, Г. Г. Драннік, Н. М. Степанова, Т. В. Порошина, Є. В. Сидоренко // Актуальні проблеми нефрології: зб. наук. праць / за ред. Т. Д. Никули / Міністерство охорони здоров'я України; Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця. – К. : Задруга, 2008. – Вип. 14. – С. 46-55. (Визначені показники цитокінової ланки, проведений статистичний аналіз).
6. Сидоренко Є. В. Стан імунітету у хворих на гострий та хронічний пієлонефрит / Є. В. Сидоренко, Г. М. Драннік, В. Є. Дріянська, С. П. Пасечніков, Ф. З. Гайсенюк, О. В. Лавренчук, Н. М. Степанова, О. П. Петрина, О. Д. Нікітін // Імунологія та алергологія. – 2008. - № 4. – С. 50-54. (Дослідження та аналіз стану імунітету у хворих на хронічний пієлонефрит).
7. Колесник М. О. Показники імунітету як маркери топічної діагностики інфекцій сечової системи / М. О. Колесник, В. Є. Дріянська, Г. М. Драннік, Н. М. Степанова, Є. В. Сидоренко, Т. В. Порошина, Ф. З. Гайсенюк //

- Український журнал нефрології та діалізу. – 2008. - № 4 (20). – С. 30-34. (Дослідження цитокінів, Ат до ендотоксину, SLPI, написання частини статті).
8. Колесник М. О. Клініко-імунологічні та біохімічні ефекти протезфлазиду у хворих на хронічні інфекції сечової системи / М. О. Колесник, Є. В. Сидоренко, В. Є. Дряньська, Г. М. Драннік, Н. М. Степанова, А. В. Руденко, Н. А. Калініна, Л. Я. Мігаль, Л. В. Король, Г. Г. Нікуліна // Проблеми екології та медицини. – 2008. – Том 12, № 5-6. – С. 21-26. (Імунологічні та статистичні дослідження, написання статті).
  9. Дряньська В.Є., Драннік Г.М., Степанова Н.М., Сидоренко Є.В., Дряньська В.В., Калініна Н.А., Савченко В.С., Гайсенюк Ф.З. Прозапальні цитокіни у хворих на пієлонефрит з нормальною та порушеною функцією нирок, можливості імунокорекції // Імунологія та алергологія. – 2009. - № 2-3. – С. 113-119. (Визначення цитокінів, кореляція з клінічними даними, узагальнення даних, написання статті).
  10. Пат. № 22359, UA, МПК<sup>2006</sup> А61К 36/00, А61Р13/10. Спосіб лікування хворих на хронічний пієлонефрит / Степанова Н. М., Дряньська В. Є., Король Л. В., Руденко А. В., Калініна Н. А. Сидоренко Є. В. ; ІНАМНУ; № u 200611240, 25.10.2006; Опуб. 25.04.2007, Бюл. № 5. - 3 с. (Аналіз цитокінової ланки імунітету, клінічних ефектів в динаміці терапії різних груп хворих, оформлення заявки на винахід).
  11. Дряньська В. Є. Особливості імунітету у хворих на інфекції сечової системи з рецидивуючим перебігом, обумовлені різними етіологічними чинниками / В. Є. Дряньська, Н. М. Степанова, А. В. Руденко, О. П. Петрина, В. В. Кологрімова, Н. М. Малашевська, В. Т. Кругліков, Є. В. Сидоренко // Імунологія та алергологія: тези допов. VII Міждисциплінарної науково-практичної конференції "Епідеміологія, імунопатогенез, діагностика, лікування хламідіозу та TORCH-інфекцій", 20-21 грудня 2006 р., м. Київ. – 2006. - № 4. – С. 112.
  12. Сидоренко Є.В. Особливості показників імунітету у хворих на хронічний ускладнений та неускладнений пієлонефрит / Є. В. Сидоренко, В. Є. Дряньська, Н. А. Калініна, О. П. Павленко, Н. М. Степанова, В. С. Савченко, В. В. Дряньська // Імунологія та алергологія: тези допов. II Національного конгресу з клінічної імунології «Сучасні досягнення клінічної імунології та алергології», 19-21 листопада 2007 р., м. Миргород. – 2007. - № 3. – С. 107.
  13. Сидоренко Є. В. Особливості деяких факторів міжклітинної взаємодії - експресії CD95, CD54 і рівня цитокінів - у хворих на хронічні інфекції сечової системи / Є. В. Сидоренко, В. В. Дряньська, О. В. Лавренчук, Н. А. Калініна, В. С. Савченко, О. П. Петрина // Імунологія та алергологія: тези допов. X Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації, 22-23 квітня 2008 р., Київ. – 2008. - № 2. – С. 126-127.

## АНОТАЦІЯ

Сидоренко Є.В. Фактори міжклітинної кооперації імунної системи та можливості імунокорекції у хворих на хронічний пієлонефрит. - Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата медичних наук по спеціальності 14.03.08 – імунологія та алергологія - Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, 2009.

Дисертація присвячена визначенню показників стандартного імунітету і факторів міжклітинної кооперації імунної системи як складових етіопатогенезу хронічного пієлонефриту та доцільності використання Протефлазиду.

У хворих на ХрПН визначено стан цитокинової ланки імунітету за даними спонтанної та індукованої продукції, рівня в сироватці крові та сечі про- (ІЛ-1, -6, -8, ФНПб,  $\gamma$ -ІФ) та протизапальних (ІЛ-4, -10, ТФР- $\nu$ ) медіаторів, їх етіозалежні особливості. Виявлено високі рівні в крові Ат до ЕТ (IgG), лімфоцитів, що експресують рецептори до  $\gamma$ -ІФ - CD119+, молекули міжклітинної адгезії ICAM-1 - CD54+ і проапоптотичні маркери - CD95+. Показано, що хворі на інфекції сечової системи мають підвищений рівень SLPI в крові та сечі, найбільш високі показники в крові реєструються при гострому/загостренні хронічного пієлонефриту, а в сечі – у разі циститу, що може бути додатковим маркером топічної діагностики.

У хворих на ХрПН з діагностичним підвищенням титрів антитіл (IgG) до Herpes simplex virus, Cytomegalovirus, Toxoplasma gondii та/або Chlamydia trachomatis продемонстровані виражені клініко-мікробіологічні та імунологічні ефекти Протефлазиду, що свідчить про доцільність його використання в комплексній терапії з метою модуляції цитокинової ланки імунітету для підвищення ефективності лікування, зменшення частоти рецидивів та запобігання погіршенню функції нирок.

Ключові слова: цитокіни, міжклітинна кооперація, хронічний пієлонефрит, імунокорекція, протефлазид.

## АННОТАЦИЯ

Сидоренко Е.В. Факторы межклеточной кооперации иммунной системы и возможности иммунокоррекции у больных хроническим пиелонефритом. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.08 – иммунология и аллергология – Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, 2009.

Диссертация посвящена актуальной для теоретической и клинической иммунологии проблеме – определению показателей стандартного иммунитета и факторов межклеточной кооперации иммунной системы как звеньев этиопатогенеза хронического пиелонефрита и целесообразности использования Протефлазида в комплексной схеме лечения.

У больных хроническим пиелонефритом показаны особенности клеточного и гуморального иммунитета, уровня антител (Ат) к эндотоксину (ЭТ), секреторных лейкоцитарных ингибиторов протеиназ (SLPI), факторов межклеточной кооперации - цитокинового звена, экспрессии на лимфоцитах рецепторов к  $\gamma$ -ИФ (CD119), молекул межклеточной адгезии ICAM-1(CD54) и проапоптотических маркеров (CD95).

Выявлены изменения спонтанной и индукованой продукции, уровня в сыворотке крови моче про- (ИЛ-1, -6, -8, ФНОб,  $\gamma$ -ИФ) и противовоспалительных (ИЛ-4, -10, ТФР-в) цитокинов, высокий уровень в крови Ат к ЭТ. Показано достоверное повышение количества CD119+- (34,07±0,80% в сравнении с 13,87±0,77%, p<0,001), CD54+- (27,35±1,31 в сравнении с 16,78±0,85%, p<0,001) и CD95+-клеток (28,27±1,42 в сравнении с 11,1±1,07% у здоровых (p<0,001).

Корреляционный анализ не выявил достоверной связи между уровнями в крови CD95+-клеток и ФНО-б, а также спонтанной продукцией клетками этого цитокина. В то же время, выявлено существование корреляционной связи между числом CD95+-клеток и уровнем в крови ТФР-в, а также с продукцией этого лимфокина в условиях *in vitro*. Высокие уровни ТФР-в, так же как и ICAM-1+клеток, выявленные у больных с хронической инфекцией почек, на фоне высокой продукции ФНО-б могут способствовать антиапоптотическому эффекту, описанному некоторыми исследователями.

У больных с инфекциями мочевой системы продемонстрировано повышенный уровень SLPI в крови (2463±152 в сравнении с 1181±76) и моче (3535±183 в сравнении с 269±18 пг/мл у здоровых) (P<0,001), наиболее высокие показатели в сыворотке крови регистрируются при остром/обострении хронического пиелонефрита (3223±410), а в моче – при цистите (4171±225 пг/мл), что может быть дополнительным маркером топической диагностики. Это тем более интересно в связи с тем, что сравнительный анализ уровней цитокинов крови и мочи у больных с хроническим пиелонефритом и циститом выявил достоверную разницу только по более высокому уровню в крови ФНО-б у больных с циститом (99,67±8,5 и 43,51±5,0 пк/мл (p<0,01).

Выявлены некоторые этиозависимые особенности иммунограммы и цитокинового звена – группа больных ХрПН с наличием *E. Coli* в образцах мочи имела более высокую продукцию провоспалительных ИЛ-1, -8 клетками и уровень их, а также ИЛ-6 в моче. Наиболее низкими были продукция  $\gamma$ -ИФ при выявлении *Ch. trachomatis*, а уровень его в моче - при наличии в крови Ат к *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus* и *Toxoplasma gondii*, что может свидетельствовать о целесообразности коррекции интерферонового звена у таких пациентов.

Определяли клиничко-микробиологические (60 больных) и иммунологические (25 больных) эффекты Протефлазида (контрольные группы, соответственно, 90 и 20 пациентов) у больных хроническим неосложненным пиелонефритом, в крови которых обнаружено диагностическое повышение титров антител (IgG) к *Herpes*

simplex virus, Cytomegalovirus, *Toxoplasma gondii* и/или *Chlamydia trachomatis*. Пациенты на фоне антибактериальной терапии (фторхинолоны, цефалоспорины, сульфаниламиды, аминогликозиды, один из которых использовали в зависимости от чувствительности возбудителей) (1 гр.) дополнительно назначали Протефлазид (2 гр.) 3 раза в день в дозе на 1-й неделе лечения по 5 капель, на 2–3-й – по 10 капель, на 4-й – по 8 капель, что способствовало позитивной динамике клинического состояния, а также функциональной активности иммунокомпетентных клеток по продукции медиаторов и состояния антиоксидантной системы.

Использование Протефлазида в комплексной терапии способствовало более выраженным клинико-микробиологическим эффектам в этой группе, а также снижению продукции провоспалительного ИЛ-8, просклеротического ТФР- $\alpha$  и уровня Ат к ЕТ. Снижение после лечения в обеих группах нормальной до этого спонтанной продукции  $\gamma$ -ИФ можно считать результатом влияния антибиотикотерапии, но использование Протефлазида способствовало менее выраженному снижению продукции этого лимфокина, что считаем позитивным ИФ-стимулирующим эффектом Протефлазида. Важным эффектом терапии с использованием Протефлазида можно считать более низкий, в сравнении с 1 гр., уровень провоспалительных цитокинов  $\gamma$ -ИФ и ИЛ-8 в моче, что отражает уменьшение воспаления *in situ*. Через 1 год после лечения уровень SLPI в крови пациентов исследуемой группы достоверно снижался и не отличался от нормы ( $1260 \pm 101$  в сравнении с  $1122 \pm 76$  пг/мл,  $p > 0,05$ ), в отличие от больных контрольной группы с более высокими показателями ( $1433 \pm 66$  пг/мл) ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования Протефлазида в комплексной терапии больных хроническим пиелонефритом с целью модуляции цитокинового звена иммунитета для повышения эффективности лечения, уменьшения частоты рецидивов и предупреждения нарушения функции почек.

Ключевые слова: цитокины, межклеточная кооперация, хронический пиелонефрит, иммунокоррекция, протефлазид.

## SUMMARY

Sydorenko E.V. Factors of intercellular cooperation of the immune system and possibility of immunocorrection in patients with chronic pyelonephritis. – Manuscript.

The dissertation for scientific degree of candidate of medical sciences on speciality 14.03.08 – immunology and allergology. – National Medical University named after O. O. Bogomolets, Ministry of Public Health of Ukraine, Kyiv, 2009

The work is dedicated to the actual problem for theoretical and clinical immunology – to determine criterious of standard immunity and factors of intercellular cooperation of

the immune system as compounds of ethiopathogenesis of chronic pyelonephritis and the advisability to use Proteflazidum in complex scheme of treatment.

In patients with chronic pyelonephritis (ChPN), the state of cytokine link of immunity by the data of spontaneous and induced production, the level of pro- (IL-1, -6, -8, TNF- $\beta$ ,  $\gamma$ -IF) and antiinflammatory (IL-4, -10, TGF- $\beta$ ) mediators in blood serum and urine, their ethioidependent peculiarities were determined. The patients showed the high level in blood of Ab to endotoxin (ET); lymphocytes expressing receptors to  $\gamma$ -IF – CD110+, molecules of intercellular adhesion of ICAM-1 – CD54+ and proapoptotic markers – CD95+. It was shown that the patients with urinary tract infections have the elevated SLPI level in blood and urine. The most high readings in blood serum are registered in acute/aggravated chronic pyelonephritis; in urine – in case of cystitis that can be an additional markers for topical diagnostics.

In patients with ChPN and diagnostically elevated titres of antibodies (IgG) to Herpes simplex virus, Cytomegalovirus, Toxoplasma gondii and/or Chlamydia trachomatis, the positive clinico-microbiological and immunological effects of Proteflazidum, that testifies to the expediency of its usage in complex therapy with the aim to modulate the cytokine link of immunity for improvement of the effective treatment, for reduction of recurrence incidence and the protection against aggravation of kidney functioning.

Key words: cytokines, intercellular cooperation, chronic pyelonephritis, immunocorrection, Proteflazidum.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕТ	-	Ендотоксин
ІЛ	-	інтерлейкін
ІСС	-	інфекції сечової системи
ІФ	-	інтерферон
ІФА	-	імуноферментний аналіз
ТФР- $\beta$	-	трансформуючий фактор росту-бета
Т-х	-	Т-хелпери
ФГА	-	фітогемаглютинін
ФНП	-	фактор некрозу пухлин
ХНН	-	хронічна ниркова недостатність
ХрПН	-	хронічний пієлонефрит
ШКФ	-	швидкість клубочкової фільтрації
CD	-	кластер диференціювання

ICAM	-	intercellular cell adhesion molecules
Ig	-	імуноглобулін
SLPI	-	secretory leucocyte protease inhibitor