

ВПЛИВ ПРОТЕФЛАЗИДУ НА ПРОДУКЦІЮ ЦИТОКІНІВ І СИСТЕМУ ПОЛ-АОЗ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ПІЕЛОНЕФРИТ

УДК612.017:616.6-002.2-022.7

Є.В. Сидоренко, В.Є. Дряньська, Н.М. Степанова, А.В. Руденко,

В.Т. Кружліков, Л.Я. Мігаль, Л.В. Король, Г.Г. Нікуліна, О.В. Стрєбкова, Г.М. Драннік
Інститут нефрології АМН України

Резюме. Обстежено 40 жінок з хронічним неосложненим піелонефритом, в крові которых определены діагностически значимые титри IgG к Herpes simplex virus, Cytomegalovirus и Toxoplasma. І-ю групу (n=15) составили пациентки, которые получали антибактериальную терапию согласно результатам бакпосева мочи, во ІІ-ю групу (n=25) вошли больные, получавшие дополнительно протефлазид. Выявлено, что после лечения у пациенток обеих групп снизилась спонтанная продукция γ -ІФ иммунокомпетентными клетками, однако у больных получавших протефлазид снижение продукции этого цитокина было менее выраженным. Статистически значимое снижение активности провоспалительных цитокинов γ -ІФ и ІЛ-8 в моче, по сравнению с контрольной группой, свидетельствует о нормализации воспалительного процесса в мочевой системе. Динамику нормализации МДА и ТР как показателей ПОЛ-АОЗ мы расцениваем как позитивный эффект при дополнении антибиотикотерапии протефлазидом.

Ключевые слова: хронический пиелонефрит, цитокины, ПОЛ-АОЗ, протефлазид.

У сучасній медицині проблемою є тенденція зростання розповсюдженості запальних захворювань сечової системи, серед яких особливе місце за соціальною значимістю та труднощами терапії займає хронічний піелонефрит (ПН) [3, 12, 16, 18]. Методів терапії хворих на ПН із кожним роком стає все більше й від використання того чи іншого підходу залежить її ефективність. В арсеналі лікаря є багато препаратів: серед них антибактеріальні нових поколінь, до яких мікроорганізми ще не виробили резистентності.

Раціональне використання антибактеріальних препаратів для лікування хворих на ІСС визначається топічним діагнозом, а при встановленому діагнозі «хронічний піелонефрит» характеристиками етіологічного чинника, наявністю ускладнюючих факторів, функціональним станом нирок та особливостями стану імунітету хворого [3, 5, 13, 8, 17, 20].

Імунологи мають позитивний досвід використання імунотропних препаратів, які сприяють підвищенню ефективності лікування та зниженню частоти рецидивів у разі хронічних інфекцій [6, 15]. Крім того, вітчизняними дослідниками розроблено ряд нових препаратів, використання яких у комплексному лікуванні інфекцій сечової системи, у тому числі хронічного піелонефриту, дозволяє підвищувати його ефективність.

Нашу увагу привернув препарат протефлазид, який добре себе зарекомендував як імуномодуючий засіб, що використовують для профілактики та лікування хворих на вірусні та бактеріальні інфекції [7, 10, 11]. Протефлазид – препарат противірусної та імуномодуючої дії рослинного походження вітчизняного виробництва. До його складу входять флавоноїдні глікозиди, що утримуються в *Deschampsia caespitosa* L. і *Calamagrostis epigeios* L., які здатні пригнічувати вірусоспецифічні ферменти ДНК-полімерази та тимідинкінази у вірусінфікованих клітинах. Це призводить до зниження здатності або повної блокади реплікації вірусної ДНК і, як наслідок, перешкоджає розмноженню вірусів. Одночасно протефлазид викликає збільшення продукції ендогенних (α - і γ -інтерферонів, що збільшує неспецифічну резистентність організму до вірусної і бактеріальної інфекції та має антиоксидантні властивості [7].

У той же час, відомо, що інтерферонова ланка імунітету впливає на продукцію інших цитокинів, тому що активність Т-хелперів 1 типу (які продукують γ -ІФ) пригнічує продукцію Т-хелперами 2 типу та Т-регуляторними відповідних медіаторів імунітету – ІЛ-10, ТФР- β . Важливу роль відіграє хемоатрактант ІЛ-8, клітинами-продуцентами якого є моноцити/макрофаги, ендотеліоцити, лімфоцити, нейрофілі, фібробласти тощо, і завдяки якому мобілізуються нейтрофіли та формується тривалий цикл запалення [21].

Під впливом ІЛ-8 відбувається визволення ферментів із внутрішньоклітинних органел нейтрофілів та стимулюються реакції неспецифічної резистентності, пов'язані з мобілізацією функціональних резервів організму у відповідь на дію шкідливого патологічного фактора. Серед таких найпоширеніших патологічних процесів є вільнорадикальне окислення (ВРО) – один із універсальних механізмів uszkodження клітин, але разом із тим і один із метаболічних шляхів їх нормального функціонування.

Метою роботи (у зв'язку з викладеним) було дослідження функціональної активності імунітету клітин з продукування цитокинів (γ -ІФ, ІЛ-8, ІЛ-10, ТФР- β), стану антиоксидантної ферментемії та активності процесів пероксидації у хворих на хронічний піелонефрит у динаміці лікування протефлазидом для уявлення про доцільність використання цього препарату.

Матеріали та методи дослідження. У дослідження включено 40 жінок, хворих на хронічний не ускладнений піелонефрит, у крові яких визначено діагностичне підвищення титрів антитіл (IgG) до Herpes simplex virus, Cytomegalovirus та Toxoplasma gondii. Групу контролю склали 15 здорових донорів. Верифікацію діагнозу здійснювали на підставі оцінки скарг, даних анамнезу, результатів клініко-лабораторних та інструментальних методів дослідження нирок.

До 1-ої групи ввійшло 15 жінок – пацієнти, які отримували антибактеріальну терапію (АБТ) згідно з результатами бакпосіву сечі (призначали пefлоксацин, левофлораксацин, цефтибутен), до 2-ї групи - 25 хворих, які додатково до антибактеріальної терапії отримували протефлазид.

Протефлазид (1 мл якого містить 0,3 мг суми карбонових кислот у перерахунку на яблучну кислоту, 0,32 мг флавоноїдів у перерахунку на рутин, спирт етиловий, воду) призначали на фоні антибактеріальної терапії за такою 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. Побічних реакцій від препарату не зафіксовано.

За віком та тривалістю захворювання пацієнтки обох груп майже не відрізнялись. Так, середній вік хворих 1-ї групи склав 32,1 \pm 3,0 року, 2-ї – 33,6 \pm 2,2 (p=0,64); середня тривалість захворювання –11,5 \pm 2,4 та 16,1 \pm 2,6 років, відповідно

($\chi^2=108$, $p=1,0$). Вміст у крові діагностично значущих титрів Ig G до Herpes simplex virus, Cytomegalovirus та Toxoplasma у хворих обох груп статистично не відрізнявся та складав відповідно: $\chi^2=1,75$, $p=0,18$; $\chi^2=1,14$, $p=0,28$ та $\chi^2=1,16$, $p=0,28$.

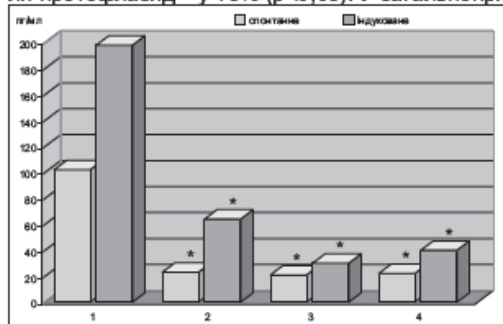
Для визначення титрів IgG до Herpes simplex virus, Cytomegalovirus та Toxoplasma gondii використовували тест-системи виробництва «Orgenics» (Ізраїль) та «Вектор-Бест» (Росія).

Вивчалась спонтанна та індукована продукція клітинами периферичної крові цитокінів (γ -ІФ, ІЛ-8, ІЛ-10, ТФР- β) до та після лікування за допомогою імуноферментного аналізу за інструкцією виробника тест-систем «Diacone» (Франція) і TRG (Німеччина).

Визначали показники антиоксидантної дії ферментів та оцінювали активність пероксидації ліпідів (ПОЛ). Інтенсивність вільнорадикального окислення оцінювали шляхом спектрофотометричного визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) в крові та сечі [2]. Вміст в сироватці крові ферменту антиоксиданту церулоплазміну (ЦП) визначали за реакцією з п-фенілендіаміндігідрохлоридом; загальну пероксидазну активність (ЗПА) еритроцитів визначали за реакцією з індігокарміном [9]; вміст трансферину (ТР) в сироватці крові за реакцією з залізо-амоній цитратом [1]; вміст SH-груп крові оцінювали за методом, що запропонований Фоломєєвим [14].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою одно- та багатофакторного дисперсійного аналізу (програми «Microsoft Excel», «SPSS» та «Statistica»). Визначали середнє значення показників (M), його похибку (m), Хі-квадрат (χ^2) та достовірність змін показників (p).

Результати і обговорення. Клінічне обстеження продемонструвало, що через 10 днів лікування хворі на ПН досліджуваної групи скарг на дизурію, ніктурію та часте сечовипускання не мали на відміну від контрольної групи, в якій у 20% жінок ці скарги зберігалися. Упродовж року в 30% хворих контрольної групи був рецидив захворювання, а у жінок, що отримували протепфлазид – у 16% ($p<0,05$). У загальноприйнятих аналізах сечі та крові різниці між групами не встановлено.



Мал. 1. Продукція γ -ІФ у здорових донорів (1), хворих на хронічний ПН до лікування (2), після АБТ (3) та АБТ+Протепфлазид (4).

* - різниця достовірна в порівнянні з нормою

+ - різниця достовірна при порівнянні груп після лікування

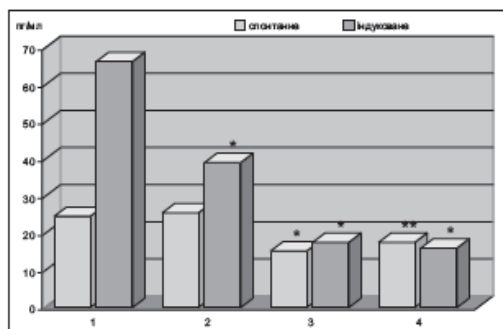
Для уявлення про стан функціональної активності Т-хелперів 1 і 2, а також Т-регуляторних лімфоцитів у хворих та динаміку після терапії визначали продукцію, відповідно, γ -ІФ, ІЛ-10 та ТФР- β .

Спонтанна продукція γ -ІФ, яка у хворих не відрізнялась від норми, після лікування була знижена в обох групах, але у пацієнтів, що отримували протепфлазид, цей показник достовірно вище ($p<0,05$); індукована продукція, яка була знижена до лікування, після терапії знижалась ще більше в обох групах (мал. 1). Високий рівень цього лімфокіну в сечі ($1,68\pm 0,14$) знижувався після терапії, але якщо в досліджуваній групі він становив $0,89\pm 0,14$ ($0,0007\pm 0,0001$ у нормі), то в групі контролю був значно вище – $4,6\pm 0,4$ ($p<0,01$).

Знижена продукція протизапального цитокіну ІЛ-10 не змінювалась після лікування в обох групах (мал. 2). Якщо в нормі ІЛ-10 в сечі не визначався, а у хворих становив $2,52\pm 0,18$, то після лікування знижувався в обох групах у 2,5-3 рази, і різниці між групами не було.

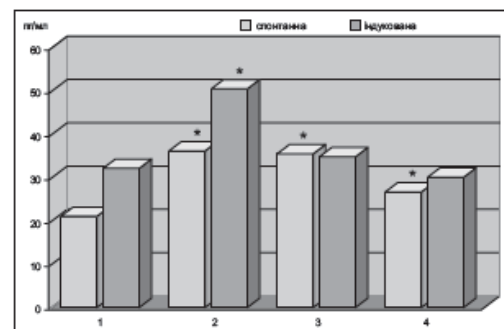
Особливий інтерес представляло дослідження ТФР- β – поліфункціонального цитокіну, який бере участь у регуляції процесів проліферації, диференціації, міграції та апоптозу, а також низки метаболічних реакцій у різних клітинах-мішенях. Внаслідок чисельних досліджень встановлено, що на завершальних етапах запального процесу ТФР- β активно стимулює хемотаксис Т-клітин, моноцитів, лейкоцитів і фібробластів в інтерстиції [4]. In vitro показано, що ТФР- β безпосередньо стимулює синтез білків міжклітинного матриксу (колагенів I, II, V типів, а також фібронектину та протеогліканів) [19]. Таким чином, біологічні ефекти ТФР- β реалізуються практично на всіх етапах формування тубулоінтерстиціальних та гломерулярних ушкоджень у разі запального процесу.

Наші дослідження виявили підвищення рівня ТФР- β , що свідчить про високу активність Т-рег у хворих на ХІСС (мал. 3).



Мал. 2. Продукція ІЛ-10 у здорових донорів(1), хворих на хронічний ПН до лікування (2), після АБТ (3) та АБТ+Протепфлазид (4).

* - різниця достовірна в порівнянні з нормою



Мал. 3. Продукція ТФР- β у здорових донорів (1), хворих на хронічний ПН до лікування (2), після АБТ (3) та АБТ+Протепфлазид (4).

* - різниця достовірна в порівнянні з нормою

+ - різниця достовірна при порівнянні груп після лікування

Лікування за допомогою протекфлазиду сприяло зниженню спонтанної продукції ТФР-β ($p < 0,05$), тоді як у контрольній групі не відбувалось достовірних змін і продукція цього фактору росту залишалась високою. Індукована продукція ТФР-β знижувалась після лікування в обох групах до норми. Після лікування в обох групах не виявлено достовірних змін цього показника в сечі, який був у хворих підвищеним у 10 разів. Так, якщо в пацієнтів активність ТФР-β у сечі до лікування становила $5,1 \pm 0,42$, то в дослідженій групі після терапії – $3,1 \pm 0,43$, а в групі контролю $2,7 \pm 0,31$ пкг/мл ($p > 0,05$).

Підвищений більше ніж у 3 рази рівень спонтанної та індукованої продукції ІЛ-8 достовірно знижувався в групі хворих, що приймали протекфлазид, від $38 \pm 2,3$ до $28,8 \pm 3,1$ пкг/мл ($p < 0,05$). Високий рівень цього цитокіну в сечі після лікування знижувався у 2 рази – від $2,52 \pm 0,14$ до $1,04 \pm 0,20$.

При вивченні стану антиоксидантного захисту та активності оксидативних процесів у крові хворих на хронічний ПН встановлено, що при розвитку запальних процесів сечової системи порушується рівновага між антиоксидантним захистом та активністю оксидативних процесів (табл. 1).

Таблиця 1

Активність антиоксидантних ферментів та процесів ПОЛ у хворих на хронічний пієлонефрит

Показник, (М±м)		Контроль, n=22	ПН, n=59
Вміст у сироватці	ТР, ум. од	5±1	8,28±0,73*
	ЦП, г/л	0,218±0,011	0,211±0,014
	SH-групи, ммоль/л	2,22±0,02	2,23±0,037
ЗПА ммоль/хв. на 1г Нв		457±20	485±18
М Д А	Сироватка	ммоль/л	119±35
	Еритроцити		549±51
Сеча, ммоль/л		2,6±0,2	3,08±0,26

Примітка: * статистично достовірна різниця порівняно з контролем ($p < 0,05$)

Як видно з наведених даних, у хворих на хронічний ПН спостерігається підвищення в сироватці крові вмісту ТР у 1,65 рази, а показники вмісту ЦП і SH-груп в сироватці крові та ЗПА еритроцитів – статистично не відрізнялися від показників у практично здорових людей. Також у хворих на ПН у крові підвищувалася концентрація продуктів ПОЛ, а саме – МДА в сироватці крові відповідно у 2,6 рази порівняно з нормою ($p < 0,05$). Вміст МДА в еритроцитах та його екскреція з сечею у хворих на хронічний ПН здебільшого знаходилися в межах норми. Отже, можна припустити, що активність та локалізація інфекційного процесу в сечовому тракті та розвиток ПН у певній мірі негативно впливають на реагування системи антиоксидантного захисту (АОЗ). З іншого боку, порушення балансу між системою АОЗ та ПОЛ в певній мірі може впливати на розвиток, активність та хронізацію запального процесу в нирках.

Все це узгоджується із сучасним уявленням про патогенез ПН. Так, відомо, що формування процесу інфекційного запалення в нирках та сечовивідних шляхах пов'язано з інтенсифікацією деструкції біомембран й гіперактивністю фосфоліпази та ПОЛ. Внаслідок розвитку запального процесу в нирках активізуються процеси вільнорадикального окислення та підвищується продукція активних форм кисню. Моноцити та макрофаги, що, мігрують до тканин у відповідь на дію імунних комплексів, здатні продукувати активні форми кисню, які поряд з ініціацією синтезу простагландинів з арахідонової кислоти та активацією лізосомальних протеїназ призводять до пошкодження клітинних мембран паренхіми нирки. Одночасно з розвитком мембранолітичних процесів у клітинах ниркової тканини й прогресуванням ПОЛ відбувається активізація ендогенних фосфоліпаз.

Після застосування традиційного антибактеріального лікування у хворих на ПН у крові спостерігалася доволі чітка тенденція до зниження концентрації МДА, що, насамперед, зумовлено дією антибактеріальних препаратів (табл. 2). Аналогічну тенденцію до змін мав й показник ЗПА еритроцитів. Інші показники АОЗ крові при цьому залишалися в межах значень до лікування.

Застосування разом із традиційним антибактеріальним лікуванням протекфлазиду сприяло достовірному зниженню в сироватці крові ТР та МДА (табл. 2) – нормалізація відбувалась у 66% та 70% хворих відповідно. Показник вмісту ЦП у 50% хворих позитивно змінювався, ЗПА еритроцитів і концентрація МДА в сечі не змінювалися порівняно зі станом до лікування, а вміст МДА в еритроцитах мав тенденцію до негативного зростання середніх показників (хоча у половини хворих відмічалася зниження показника порівняно з початком лікування).

Таблиця 2

Зміни показників систем ПОЛ-АОЗ в умовах лікування хворих на хронічний пієлонефрит

Показник		Традиційне лікування (n =15), до/ після лікування	Традиційне лікування + Протекфлазид (n = 25), до/після лікування
Вміст у сироватці	ТР, ум. од	10,7±1,5*/13,1±1,8*	8,2±0,57*/6,19±0,51**
	ЦП, г/л	0,191±0,01/0,173±0,012*	0,208±0,011/0,210±0,012
ЗПА ммоль/хв на 1г Нв		612±11/530±79	448±32/418±27
М Д А	Сироватка	Мкмоль/л	514±32*/450±28*
	Еритроцити		604±81/488±48
Сеча, ммоль/л		2,89±0,41/2,89±0,039	2,79±0,31/2,81±0,027

Примітка: * статистично достовірна різниця порівняно з нормою ($p < 0,05$),

** статистично достовірна різниця порівняно зі станом до лікування ($p < 0,05$)

Таким чином, лікування за допомогою протекфлазиду сприяло зниженню продукції Т-регуляторними клітинами про-склеротичного фактору – ТФР-β що можна вважати позитивним наслідком. Зниження після лікування в обох групах спонтанної продукції гамма-ІФ імункомпетентними клітинами можна вважати результатом впливу антибіотикотерапії, але використання протекфлазиду сприяло меншому зниженню продукції цього прозапального цитокіну, що також є позитивним ефектом. Важливим ефектом терапії з використанням протекфлазиду можна вважати нижчу порівняно з контрольною групою активність прозапальних цитокінів гамма-ІФ та ІЛ-8 у сечі, що вказує на нормалізацію процесу запалення в сечовій системі. Традиційна антибіотикотерапія в більшості випадків позитивно впливає на показники ПОЛ-АОЗ у крові, але використання протекфлазиду дозволило отримати більш виражену динаміку МДА та ТР у сироватці крові у відповідь на лікування.

Отримані дані дозволяють вважати доцільним використання протекфлазиду у хворих на хронічний пієлонефрит, особливо у тих, у крові яких визначено діагностичне підвищення титрів антитіл (IgG) до Herpes simplex virus, Cytomegalovirus та Toxoplasma gondii.

Література

1. Бабенко Г.О. Визначення мікроелементів у клінічних лабораторіях. - Київ.: Здоров'я, 1968. - 136 с.
2. Возіанов О.Ф., Пасечников С.П., Нікуліна Г.Г. та співавт. Спосіб диференціальної діагностики гострого пієлонефриту // Патент на винахід № 98052697 від 25.05.1998р.
3. Дядьк А.И., Колесник Н.А. Инфекции почек и мочевыводящих путей. - Донецк: КП «Регион», 2003. - 398 с.
4. Зубова С.Г., Окулов В.Б. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей α и трансформирующего фактора роста β в процессе ответа макрофага на активацию // Иммунология. - 2001. - №5.- С. 18-22.
5. Колесник М.О., Степанова Н.М. Діагностика і лікування інфекцій сечової системи з позицій доказової медицини // Укр. Журнал нефрології та діалізу. - 2006.- № 2 (10).- С. 45-49.
6. Кузнецов В.П., Чихладзе М.В., Сепиашвили Я.Р. Тактика иммунокорректирующего лечения при инфекциях // Аллергология и иммунология. - 2001. - Т. 2, № 1.- С. 92-104.
7. Малевич М.П., Дюдюк С.Т., Рибалко С.Л. та ін. Интерферномодулююча та апоптозомодулююча активність препарату Протекфлазид // Вісн. Вінницького державного медичного університету. - 2002. - №6 (2). - С. 281-284.
8. Могутюв А.В. Особенности антибактериальной терапии пиелонефритов // Здоровье мужчины. - 2007.- №1. -С. 119-121.
9. Попов Т., Нейковска Л. Метод определения пероксидазной активности крови // Гигиена и санитария. - 1971. - №1. - С. 89-91.
10. Протекфлазид. Информационные материалы по свойствам и методикам применения. -К. - 2002. - 69 с.
11. Ромащенко О.В., Рибалко С.Л., Дюдюк С.Т., Руденко А.В. Протекфлазид. Информ. материалы по свойствам и методам применения. - Киев, 2002. - 69 с.
12. Семидоцкая Ж.Д. Пиелонефрит // Доктор. 2001. - № 6. - С. 37-40.
13. Степанова Н.М. Принципи діагностики та лікування хворих із інфекціями сечової системи // Ліки України. - 2004. - № 11. - С. 21-26.
14. Фоломеев В.Ф. Фотоколориметрический ультрамикрометод количественного определения сульфгидрильных групп белка и небелковых соединений крови // Лаб.дело. - 1981. - № 1. - С. 33-35.
15. Чернушенко Е.Ф. Иммунокорректирующая терапия // Журнал практического врача. - 2001. - № 1. - С. 2-4.
16. Bass P., Mitchell C. Urinary tract infections // Prim. Car. Clin. Off. Pract. -2003. -Vol. 30 - P. 239-242.
17. Daza R., Gutierrez J., Piedrola G. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections // Int. J. Antimicrob. Agents. -2001. - Vol. 18. - P. 211-215.
18. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs // Amer. J. Med.- 2002. - Vol. 113 (Suppl.1A). - P. 1-5.
19. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M. et al. Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cell with regulatory properties isolated from peripheral blood // J. Exp. Med. - 2001. - Vol. 193. - P. 1285-1294.
20. Miller O., Hemphill R. Urinary tract infection and pyelonephritis // Emerg. Med. Clin. N. Amer. - 2001. -Vol.19. - P. 655-674.
21. Tjabringa G., Vos J., Olthuis D., Ninaber D. Host defense effector molecules in mucosal secretions // Immunology and Medical Microbiology. - 2005. - V.45. - P. 151-158.

Summary

INFLUENCE OF PROTEFLAZID ON PRODUCTION OF CYTOKINES IN THE PATIENTS WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS

E.V. Sidorenko, V.E. Driyanska, N.M. Stepanova, A.V. Rudenko, V.T. Kruglikov, L.A. Migal, L.V. Kard, G.G. Nikulina, O.V. Strebkova, G.N. Drannik

Institute of Nephrology AMS of Ukraine

We observed 45 women with chronic uncomplicated pyelonephritis which had diagnostic titers of IgG to Herpes simplex, Cytomegalovirus and Toxoplasma. The 1 group (n=20) received antibiotics according the results of bacteriological analysis, the 2 group (n=25) had additionally Proteflazid. After the treatment both group had decreased of spontaneous production of γ-IF by immune cells, but the ratio of this process in the 2 group was significantly lower (p<0,001). Statistically significant decreasing of activity of proinflammation cytokines γ-IF and IL-8 in urine at group 2 (p<0,001) showed normalization of inflammation processes in urinary tract. The normalization of MDA and TR we regard as a positive effects of Proteflazid in addition to antibiotic therapy.