

# Показатели иммунитета у больных с терминальной стадией почечной недостаточности и уремический токсин пара-крезол (обзор литературы и собственные исследования)

Several immunity parameters in patients with terminal kidney insufficiency and uremic toxin para-cresol (literature review and own results)

*E.N. Stepanova, V.N. Sinyukhin, A.V. Sivkov, S.V. Arzumanov, T.A. Korobova*

Uremic toxin para-cresol was under active investigation last years. Concentration of para-cresol is known to be high during the infection in patients with terminal chronic kidney insufficiency (CKN). We aimed at studying the immunity in patients being on hemodialysis.

Two groups of patients were included. In a first group were 6 patients with pyoinflammatory process in the area of vascular port, 7 another patients formed the second group without inflammation. Control group consisted of healthy patients. Para-cresol was evaluated in blood samples of all patients. In the first group with high para-cresol concentrations non-specific activity of leukocytes was increased, their function activity however decreased. T-cell immunity parameters were depressed in patients of the first group. In patients of second group these changes were less pronounced. B-lymphocyte absolute numbers were reduced in patients of the first group, compared to the healthy donors and second group patients. Serum concentration of immunoglobulins were also alternated: in first group immunoglobulins G were low.

Drawing a conclusion, increased concentrations of para-cresol could be linked to the decreased activity of the natural, T-cell and humoral immunity.

**Е.Н. Степанова<sup>2</sup>, В.Н. Синюхин<sup>1</sup>, А.В. Сивков<sup>1</sup>, С.В. Арзуманов<sup>1</sup>, Т.А. Коробова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

<sup>2</sup>ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия постдипломного образования» Минздрава России

**П**рогрессирование хронической почечной недостаточности (ХПН) приводит к увеличению показателя смертности больных за счет возникновения сопутствующих сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний [1-4]. У больных с ХПН в возрасте старше 65 лет, по сравнению с людьми без этой патологии, наблюдается двукратное увеличение показателя смертности, а в возрасте от 16 до 49 лет он увеличивается в 36 раз. Все осложнения непосредственно связаны с развитием хронического воспалительного процесса и на фоне иммунодефицитного состояния (ИДС) [3, 4].

В настоящее время термин «уремия» включает не только нарушение функции почек, но и накопление в организме большого количества различного рода соединений, которые выводятся почками и называются уремиическими токсинами. Считают, что они оказывают отрицательное влияние на биологические функции организма и иммунитет [5].

## **Состояние иммунитета у больных ХПН**

Известно, что в физиологических условиях иммунная система контролирует воспаление на уровне врожденного и приобретенного им-

мунитета. В тоже время в условиях уремиического окружения, в частности под действием связанных с белками уремиических токсинов, которые не выводятся из организма при гемодиализе, происходит постоянная активация воспалительной активности клеток организма. Это приводит к накоплению продуктов оксидативного стресса, принимающих участие в спонтанной активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета, с одновременным снижением их иммунной активности. В дальнейшем запускается апоптоз иммунокомпетентных клеток, который приводит к их истощению и формированию иммунодефицитного состояния [5].

У больных с ХПН нарушается функция лейкоцитов, что в значительной степени увеличивает вероятность возникновения инфекционного процесса [6, 7]. Этот дефект связан с уремиическими токсинами, перенасыщением железом, анемией и плохой биосовместимостью с диализными мембранами [6]. Известно, что у пациентов с ХПН при скорости гломерулярной фильтрации менее 30 мл/мин, часто возникает бактериемия [8]. После проведения стратификации по полу, возрасту, расовой принадлежности и диабету, сепсис оказался причиной смерти у значительной части диализных больных [9]. Другими факторами, предраспо-

лагающим к возникновению инфекционного процесса при ХПН, являются дефекты функционирования Т- и В-лимфоцитов, которые приводят больных, находящихся на гемодиализе, к неадекватной реакции на вакцинацию и инфекции [10].

Оксидативный стресс и воспалительная реакция связаны с активацией врожденного иммунитета, и необходимы для запуска приобретенного (адаптивного) иммунитета [11]. При физиологических условиях, после формирования приобретенного Т- и В-клеточного иммунитета и включения эффекторных механизмов защиты, запускаются регуляторные механизмы, в частности активируются регуляторные супрессорные Т- и В-лимфоциты, которые полностью прекращают активацию всех звеньев иммунитета, в том числе и воспаления. По данным литературы известно, что при ухудшении функции почек в организме больного повышается активность оксидативного стресса и воспаления [12, 13].

При ХПН имеется прямая взаимосвязь между накоплением в крови пациентов уремических токсинов и следующих биомаркеров оксидативного стресса: продукты глубокого окисления белков (advanced oxidative protein products, АОРР), активность миелопероксидазы, и показатели активности воспалительного процесса (С-реактивный белок и провоспалительные интерлейкин-1 и интерлейкин-6) [14].

Постоянная активация иммунной системы при уремии приводит к хронизации воспалительного процесса и возникновению атеросклероза, с поражением сердечно-сосудистой системы [15].

Источником продуктов оксидативного стресса, а также провоспалительных интерлейкинов являются фагоцитарные клетки крови, в первую очередь активированные полиморфоядерные лейкоциты и моноциты. Эти клетки не только фагоцитируют все чужеродное, но и распознают молекулярные структуры антигенов (паттерны), не характерные для собствен-

ного организма [16]. В ходе фагоцитоза клетки активируются, в них образуются и накапливаются окисленные формы кислорода и различных радикалов, участвующих в оксидативном стрессе. Одновременно с фагоцитозом происходит распознавание чужеродных молекулярных структур через соответствующие паттерн-распознающие рецепторы врожденного иммунитета, которые находятся как на поверхности (Толл-рецепторы-TLR), так и в цитоплазме этих клеток [16]. Результатом такого распознавания является запуск продукции провоспалительных интерлейкинов-интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) – активаторов системного воспаления [17].

У больных, находящихся на гемодиализе, повышена экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах и TLR4 на нейтрофилах, что сопровождается увеличением продукции цитокинов в ответ на активацию TLR 4 липополисахаридами [17].

Известно, что активированные фагоцитарные клетки запускают не только системное, но и местное воспаление. Так, на поверхности моноцитов и макрофагов находятся рецепторы – ловушки (скавенджер-рецепторы, CD36), с помощью которых эти клетки очищают ткани и сосуды, на которых сформированы атеросклеротические бляшки из окисленных липопротеинов. При этом моноциты и макрофаги активируются, и участвуют в запуске местного воспалительного процесса [18].

При уремии наблюдается постоянное повышение концентрации маркеров гликирования и оксидативного стресса, что приводит к накоплению продуктов деградации белков и липидов, как в сосудистом русле, так и в тканях, в частности в интиме сосудов [19]. Активация механизмов распознавания моноцитами и макрофагами окисленных продуктов в тканях приводит к постоянной самоактивации воспалительного процесса у больных с ХПН [20].

Персистирующее системное и

местное воспаление становится основным фактором риска нарастания тяжести этого заболевания [21, 22, 23]. Следует подчеркнуть, что спонтанная воспалительная активность клеток врожденного иммунитета при уремии сопровождается снижением их защитных противомикробных функций, а именно фагоцитарной (лейкоциты и макрофаги) и антигенпредставляющей (дендритные клетки), что приводит к формированию ИДС при ХПН.

Таким образом, разработка методов уменьшения активности воспалительной реакции может стать новым способом лечения хронической болезни почек и нарастания ХПН, а также предотвращением развития ИДС [24-27].

Развитие «окислительного взрыва» в нейтрофилах в ответ на стимуляцию патогенами (прайминг лейкоцитов), является одним из основных механизмов врожденной иммунной защиты, за которым следует активация адаптивного иммунитета [28]. Прайминг лейкоцитов оказывает влияние на их жизнеспособность путем торможения процесса конституционального апоптоза [29]. Накопление уремических токсинов и хронический гемодиализ приводят к спонтанной активации нейтрофилов и возникновению порочного круга «оксидативный стресс – воспаление», с одновременным подавлением иммунологических функций у больных с ХПН [21].

При уремии инвазия микроорганизмов может привести к развитию инфекционного заболевания. Инкубация лейкоцитов здорового человека с плазмой уремического больного или содержимым диализного мешка при перитонеальном диализе, приводит к спонтанной активации показателей оксидативного стресса и позволяет предположить, что в плазме уремического больного накапливаются соединения способные влиять на процесс праймирования. И наоборот, спонтанный «окислительный взрыв» нейтрофилов уремического больного прекращается при введении плазмы крови

здорового человека и полностью останавливается при воздействии фактора активации тромбоцитов [30].

Применение гемодиализа, в отличие от гемодиализа, изменяет развитие спонтанной активации нейтрофилов. Это говорит о том, что гемодиализ способен вывести из организма целый ряд соединений, вызывающих спонтанный оксидативный взрыв в этих клетках [31].

При ХПН чрезмерная воспалительная активация клеток врожденного иммунитета приводит к формированию ИДС. В этой ситуации для разрешения воспаления организму необходима координация механизмов удаления спонтанно активированных полиморфоядерных лейкоцитов [31]. С одной стороны, увеличение скорости апоптоза вызывает уменьшение иммунного ответа, с другой – её уменьшение и замедление процесса удаления постапоптотических лейкоцитов макрофагами приводит к воспалению [32, 33]. Таким образом, необходимо сохранение баланса между про- и антиапоптотическими факторами [34]. В этой ситуации крайне важен характер «микроокружения» и сбалансированная концентрация соединений, модулирующих лейкоциты в месте воспаления. Внеклеточный ацидоз тормозит апоптоз, а внутриклеточное закисление среды лейкоцитов на фоне низкой концентрации бикарбоната в плазме крови гемодиализных больных приводит к его замедлению [27]. Гемодиализ нормализует апоптоз полиморфоядерных лейкоцитов [35-43]. ИДС при ХПН формируется не только в результате высокой провоспалительной активности нейтрофилов, со снижением их функциональной активности, но и в результате изменения активности других клеток, принимающих участие в иммунном ответе.

Моноциты у больных на гемодиализе имеют все признаки стареющих клеток, обладающих повышенной склонностью к апоптозу

[35-38]. Учитывая, что одна из субпопуляций антигенпредставляющих дендритных клеток происходит из моноцитов, становится очевидным нарушение формирования специфического иммунного ответа, из-за недостаточности моноцитарных дендритных клеток. Апоптоз моноцитов снижается и переходит в нормальное состояние только при перитонеальном диализе. В этом смысле перитонеальный диализ имеет преимущество перед гемодиализом [43, 44].

У больных с ХПН вследствие повышения апоптоза лимфоцитов наблюдается В-клеточная лимфопения [39]. Т-клетки при ХПН находятся в состоянии ранней абберантной активации, за которым следует стадия их перехода в апоптотическое состояние. Следовательно, В- и Т-клеточная лимфопения являются отражением снижения функциональной активности гуморального и клеточного иммунитета при ХПН, с высокой степенью риска возникновения инфекции [40]. При использовании диализаторов с низкопроницаемыми мембранами наблюдается более высокая степень апоптоза лимфоцитов, чем с применением диализаторов с высокопроницаемыми мембранами [42].

Таким образом, накопление в организме больного с терминальной стадией ХПН большого количества соединений, которые у здоровых людей выводятся почками, приводит к развитию уремического синдрома. На этом фоне происходит спонтанная воспалительная активация клеток врожденного иммунитета, повышается апоптоз моноцитов, из которых образуются антиген представляющие дендритные клетки, Т- и В-лимфоцитов – клеток формирующих специфический иммунный ответ, что приводит к формированию ИДС [45].

#### **Уремический токсин пара-крезол**

В 2003 году Европейская группа по уремиическим токсинам опубликовала список 90 наиболее известных

токсинов [45]. В 2012 году этот список был не только расширен, но и была опубликована информация об их нормальных и токсических концентрациях, оказывающих влияние на различные биологические функции организма больного. В список этих токсинов входит и пара-крезол (п-крезол) [46].

В последнее время среди работ, посвященных исследованию уремиических токсинов, большое место занимает именно это соединение [47-49]. Показано, что в организме оно существует в основном в виде трех почти полностью связанных с альбумином соединений: п-крезола, п-крезол сульфата и глюкуронида – конъюгированного соединения, которое определяется в очень небольших количествах [50]. Установлено, что существует прямая зависимость между продукцией п-крезола и образованием конъюгатов. Считают, что проявление токсического эффекта этих соединений может отражать определение содержания общего п-крезола, который образуется после кислотного гидролиза плазмы в результате высвобождения из связанного состояния с альбумином материнской субстанции и конъюгатов в деконъюгированном состоянии [51]. Из литературы известно, что п-крезол тормозит функцию лейкоцитов, ингибируя «окислительный взрыв» у стимулированных клеток [52,53]. Он обладает способностью тормозить воспаление и противобактериальную защиту, подавляя вызванную цитокинами экспрессию молекул адгезии на эндотелии, нарушая тем самым миграцию лейкоцитов в очаг воспаления [54]. Согласно мнению J.T. Jr. de Carvalho и соавт. [53] накопление п-крезола является прогностическим фактором возникновения инфекционного процесса у больных с ХПН.

Таким образом, ХПН характеризуется расстройством функции как врожденного, так и адаптивного иммунитета, что приводит к комплексному нарушению работы иммунной системы. В тоже время механизм раз-



вития и предикторы грозного инфекционного осложнения, в организме больного с ХПН до конца не исследованы, что требует дальнейшего изучения.

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение состояния иммунитета больных с терминальной стадией почечной недостаточности на фоне гнойно-воспалительных осложнений и без них, и его взаимосвязи с концентрацией п-крезола.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью выявления ранних изменений, связанных с развитием иммунодефицитного состояния у больных ХПН, находящихся на гемодиализе, было выполнено иммунологическое обследование пациентов. Больные были разделены на две группы. I группа включала 6 больных с наличием гнойного воспалительного процесса в области сосудистого доступа, во II группе, состоящей из 7 человек, не было гнойных осложнений. Группу контроля составили здоровые доноры. Гемодиализ проводили три раза в неделю, в течение 6 месяцев до проведения исследования. Кровь у больных, находящихся на гемодиализе, исследовали через три дня после очередной процедуры и брали в объеме 10 мл в пробирки с гепарином.

Исследование состояния врожденного иммунитета включало:

а) изучение функциональной активности нейтрофилов крови в тесте НСТ (тест восстановления нитросинего тетразолия) [55]; б) определение выделения цитокинов в системе *in vitro* (ИЛ-1b, ИЛ-6, ФНО-альфа) в сыворотке и в культуральной среде, на основе среды Игла (ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН имени М. П. Чумакова») без антибиотиков с 0,6% L-глутамином и буферным раствором НЕРЕС под действием липополисахарида (ЛПС), («Sigma»).

Для проведения теста был использован нитро-синий тетразолий-НСТ («Sigma», с мол.весом 817,6), в концентрации 1 мг на 2 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ, рН 7,2-7Ю4). Для стимуляции нейтрофилов использовали 0,05% раствор опсонизированного Зимозана А (Sigma»). Учет результатов проводили под световым микроскопом (x100), путем определения процентного содержания активированных нейтрофилов с голубой «вуалью» или синими вкраплениями (диформаза) на 100 лейкоцитов.

Количественные и функциональные исследования Т- и В-клеточного иммунитета.

А. Количественное исследование показателей субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, а также НК-клеток, НК-Т клеток, активированных Т-лимфоцитов исследовали с использованием моноклональных антител методом проточной цитометрии, на двухлазерном проточном цитофлуориметре FACSCaliber (Becton Dickinson, BD)[56]). Полученные в ходе исследований данные подвергались компьютерному анализу на базе программного пакета CellQUEST (BD Biosciences). Перед началом работы аппарат проходил калибровку с применением коммерческого набора калибровочных микросфер Calibrate Beads.

В. Функциональные исследования Т-лимфоцитов проводили в системе *in vitro*, после культивирования клеток, выделенных из крови больных в градиенте плотности фиколл-верографина (р1,077), с использованием ФГА (фитогемагглютинин, «Sigma») – поликлонального активатора Т-лимфоцитов.

В некоторых исследованиях изучали влияние аутологичной сыворотки на активацию клеток пациентов с ХПН, для чего их культивировали в течение 24 часов с добавлением аутологичной сыворотки, в конечной концентрации 20%. В культуральных супернатантах через 24 часа исследовали цитокины-ИЛ1b,

ФНО-альфа, ИЛ-6, ИЛ-2, а также рецепторный антагонист ИЛ1-Ra методом твердофазного ИФА. Были использованы наборы для количественного твердофазного ИФА (ELISA) фирмы «Bender Med Systems» (Австрия). ИЛ1-Ra определяли с использованием ИФА тест системы-Quantikine R&Dsystems, Abingdon, Great Britain. Чувствительность определения ИЛ-1b составляла 10,0 пг/мл; ИЛ-6-15 пг/мл; ИЛ-2 -10,0 пг/мл; ФНО-альфа общего -25,0 пг/мл, ИЛ1-Ra-14пг/мл. Учет результатов проводили на микропланшетном спектрофотометре ELx808 фирмы «Biotek» (США) при длине волны 450 нм. Через 24 часов культивирования также изучали активацию лимфоцитов. Клетки после культивирования отмывали ФСБ (рН7,2-7,4), и окрашивали с использованием моноклональных антител к активационным маркерам Т-лимфоцитов-CD3+CD25+. Часть клеток культивировали 72 часа и затем методом проточной цитометрии определяли на них экспрессию CD71 - маркера пролиферации, и CD95 - маркера апоптоза.

При исследовании концентрации сывороточных иммуноглобулинов – IgG, А, М использовались наборы для количественного непрямого твердофазного ИФА- «Serazym Human IgM, IgG, IgA»(Seramun Diagnostica, GmbH).

Количественное определение п-крезола проводили по модифицированному методу Т. Niwa [47].

Результаты, полученные в ходе проведенных исследований, были обработаны с помощью прикладного пакета программ SPSS Statistics IBM Company. В качестве основного критерия был использован параметрический критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении концентрации п-крезола в крови больных с терминальной ХПН было установлено, что у лиц с гнойными осложнениями I группы, его содержание

составило  $68 \pm 9,3$  мкмоль/л., во II группе –  $48 \pm 8,7$  мкмоль/л., в контрольной группе –  $6,8 \pm 3,4$  мкмоль/л (рис.1).

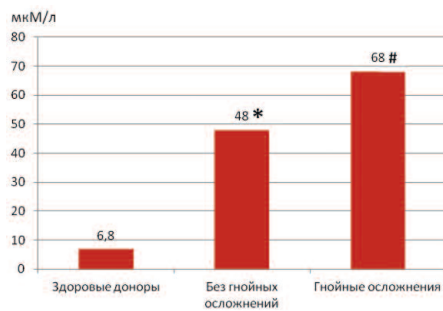


Рис.1. Концентрация пара-крезола в крови лиц с нормальной функцией почек и больных с терминальной ХПН с гнойными осложнениями и без них. \*  $P < 0,0001$  по сравнению со здоровыми донорами #  $P = 0,0021$  между 1 и 2 группами больных.

При исследовании показателей врожденного иммунитета, было показано, что в I и II группах величины спонтанной активации нейтрофилов в тесте НСТ составляли от 39–43%, по сравнению с контролем, где этот показатель был равен 10%, что может свидетельствовать об активности воспалительного процесса.

При анализе данных, полученных для стимулированной активации нейтрофилов в тесте НСТ, была выявлена разница этого показателя у пациентов I и II групп. В I группе наблюдалось снижение процентного содержания активированных нейтрофилов до 32%, по сравнению с контролем, где доля этих клеток была всегда выше 45%. Во II группе пациентов показатели стимулированного теста НСТ были выше 40% (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что у пациентов обеих групп, согласно данным спонтанного НСТ, наблюдается активация воспалительной активности лейкоцитов. При этом в I группе уменьшение показателя стимулированного НСТ, по сравнению с контрольной группой, свидетельствует о снижении функциональной активности нейтрофилов.

Таким образом, в I группе больных с большим содержанием пара-крезола в крови, на фоне повышенной неспецифической воспалительной активности лейкоцитов, наблюдается снижение их функциональной активности.

К другим важным клеточным показателям врожденного иммунитета, относится оценка функции моноцитов. В нашей работе воспалительную функцию моноцитов оценивали по продукции интерлейкинов в системе *in vitro* при культивировании в течение 24 часов с ЛПС (50 мкг/мл). В супернатантах культур исследовали провоспалительные цитокины – ИЛ-1b, ИЛ-6, ФНО-альфа. Выявлено, что во всех группах, в том числе у здоровых доноров, под действием стимуляции ЛПС наблюдается клеточная выработка этих цитокинов. Не было выявлено достоверных различий и при определении противовоспалительного рецепторного антагониста интерлейкина (ИЛ-1Ra) (табл. 1).

Следующим этапом была проведена модификация культуральной среды, при этом клетки больных пациентов с ХПН и клетки здоровых доноров культивировали с добавлением аутологичных сывороток, в конечной концентрации 20%. Для контроля клетки больных с ХПН культивировали также с добавлением сывороток здоровых доноров не содержащих уремиических токсинов. После модификации культуральной среды была выявлена разница между выработкой исследуемых интерлейкинов. По сравнению с группой здоровых доноров, у больных из I и II групп наблюдалась повышенная выработка ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-альфа. При этом показатели концентрации исследуемых интерлейкинов у пациентов I группы (с более высоким содержанием в сыворотке п-крезола) несколько превышали исследуемые показатели у пациентов II группы (табл.1). Добавление сыворотки здоровых доноров к клеткам больных с ХПН не вызвало повышение выработки провоспалительных интерлейкинов. Повышенная выработка ИЛ-1 может объясняться активацией инфламмосом при одновременным воздействием ЛПС через CD14 и TLR4 моноцитов с одной стороны, и влиянием высокой концентрации уремиических токсинов

в аутологичных сыворотках. Это подтверждается тем, что сыворотка здоровых доноров не оказывает усиливающего эффекта на продукцию провоспалительных интерлейкинов клетками тех же больных с ХПН.

Таким образом, у больных I и II групп с повышенным уровнем п-крезола в присутствии аутологичных уремиических сывороток, наблюдается повышенная продукция моноцитами воспалительных ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-альфа. В тоже время по сравнению со здоровыми донорами, концентрация противовоспалительного рецепторного антагониста ИЛ-1Ra была снижена в обеих группах обследуемых больных ХПН (табл.1).

Наши результаты позволяют предположить, что п-крезол и другие сывороточные уремиические токсины, которые не удаляются в процессе гемодиализа, усиливают продукцию моноцитами провоспалительных интерлейкинов, а также подавляют образование противовоспалительного ИЛ-1Ra.

Таким образом, исследование клеточных показателей врожденного иммунитета лейкоцитов и моноцитов у больных с ХПН, показало роль повышенной концентрации п-крезола в спонтанной активации воспалительной активности этих клеток, с одновременным снижением функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов. Возможно, что одним из механизмов поддержания спонтанной воспалительной активности клеток врожденного иммунитета у этих больных может являться нарушение продукции противовоспалительных антагонистов, в частности снижение выработки ИЛ-1Ra.

При изучении клеточного иммунитета оказалось, что количество Т-, В- и НК-клеток было неоднородно в обеих группах (табл. 1). В тоже время в I группе больных, по сравнению с контрольной группой, чаще выявляли снижение абсолютного содержания лимфоцитов, что сопровождалось снижением абсолютного содержания зрелых CD3+Т-лимфоцитов, а также

Таблица 1. Основные показатели иммунитета в исследуемых группах больных

Параметры	Больные находящиеся на гемодиализе с гнойными осложнениями	Больные находящиеся на гемодиализе без гнойных осложнений	Здоровые доноры	Достоверность различия
<b>Показатели воспалительной и функциональной активности нейтрофилов в тесте НСТ больных с ХПН, находящихся на гемодиализе</b>				
Показатели спонтанного НСТ (воспалительная активность) %	39±5	32±6	10±4	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
Показатели стимулированного НСТ (функциональная активность) %	32±7	48±9	45±3	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
<b>Концентрация интерлейкинов в культуральной среде через 24 часа без добавления аутологичной сыворотки</b>				
ИЛ-1b пг/мл	203±56	222±61	191±52	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
Ил1-Ra пг/мл	513±85	511±97	487±84	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
Ил-6 пг/мл	798±97	833±122	810±83	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
ФНО-альфа пг/мл	175±83	151±65	121±55	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
<b>Концентрация интерлейкинов в культуральной среде через 24 часа с добавлением аутологичной сыворотки</b>				
ИЛ-1b пг/мл	304±52	233±49	193±49	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
Ил1-Ra пг/мл	361±55	411±60	497±48	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
Ил-6 пг/мл	953±111	887±82	793±55	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
ФНО-альфа пг/мл	319±87	284±73	121±52	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
<b>Изменения в иммунограммах больных с ХПН, находящихся на гемодиализе</b>				
Абсолютное содержание лимфоцитов (кл/мкл)	905±152	955±212	1210±221	$p_{I-III} < 0,05$
CD3+	711±149	850±180	997±215	$p_{I-III} < 0,05$
CD3+CD4+	551±97	603±155	1223±311	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$
CD3+CD8+	270±60	411±98	452±151	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
CD16+56+	105±52	280±150	309±151	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
<b>Содержание активационных маркеров на Т-лимфоцитах больных с ХПН, находящихся на гемодиализе, после 24 и 72 часов культивирования в присутствии ФГА (10мкг/мл)</b>				
Содержание активированных Т-лимфоцитов. CD3+CD25+ через 24 часа культивирования (%)	32±8	44±11	55±6	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
Содержание активированных Т-лимфоцитов через 72 часа культивирования CD3+71+ (пролиферация) (%)	34±11	77±13	86±11	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
Содержание активированных Т-лимфоцитов через 72 часа культивирования CD3+CD95+ (апоптоз) (%)	43±7	25±6	21±8	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
<b>Выработка ИЛ-2 под действием ФГА через 24 часа культивирования лимфоцитов в среде с добавлением аутологичной сыворотки (АУС), выделенных из крови больных с ХПН, находящихся на гемодиализе</b>				
Концентрация Ил-2 (пг/мл) в культуральной среде, без АУС	104±32	195±53	249±97	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
Концентрация Ил-2 (пг/мл) в культуральной среде с добавлением АУС	73±45	122±54	246±91	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
<b>Показатели гуморального иммунитета у больных ХПН, находящихся на гемодиализе</b>				
Абсолютное содержание В-лимфоцитов, кл/мкл	131±52	210±55	322±120	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
Концентрация сывороточных иммуноглобулина IgG, г/л	7,0±0,5	11±8,3	11,0±3	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
Концентрация сывороточных иммуноглобулина IgA, г/л	0,7±0,4	2,2±0,4	2,5±1,5	$p_{I-III} < 0,05$ $p_{I-II} < 0,05$
Концентрация сывороточных иммуноглобулина IgM, г/л	0,5±0,3	0,7±0,5	1,1±0,4	$p_{I-III} < 0,05$

CD3+CD4+Т-хелперов, CD3+CD8+Т-цитотоксических лимфоцитов. Количество естественных киллеров (CD16+56+ НК-клеток) было на нижней границе нормы. Во II группе обследуемых абсолютные показатели лимфоцитов были в пределах нормы, а отклонения в иммунограмме чаще касались снижения абсолютных показателей CD3+Т-лимфоцитов и CD3+\CD4+Т-хелперов, в тоже время абсолютное содержание CD8+Т-цитотоксических и CD16+56+НК обычно не снижалось (табл. 1).

Исследование функциональной активности Т-лимфоцитов в системе *in vitro* показало, что на лимфоцитах больных I группы после 24 час. инкубации с ФГА наблюдалось снижение экспрессии активационного маркера рецептора для ИЛ-2, что проявлялось в снижении количества CD3+CD25+ активированных Т-лимфоцитов, по сравнению с лимфоцитами здоровых доноров, а также с лимфоцитами больных ХПН II группы. Исследование активационных маркеров на Т-лимфоцитах - маркера клеточной пролиферации - CD71 и маркера апоптоза - CD95, через 72 часа после начала инкубации, показало снижение пролиферативной активности (уменьшалось количество CD71+), с нарастанием апоптоза Т-лимфоцитов (возрастало количество CD95+Т-лимфоцитов) в группе пациентов I группы. Во II группе больных также как и у здоровых доноров, таких изменений не наблюдалось: среди клеток больных ХПН 2-й группы через 72 часа культивирования выявлялось повышение CD71+Т-лим-

фоцитов, количество CD95+Т-лимфоцитов было ниже (табл 1).

Исследование выработки Т-лимфоцитами ИЛ-2, в системе *in vitro* под действием ФГА, через 24 часа культивирования, показало, снижение его концентрации в культурах лимфоцитов от пациентов I группы. Во II группе обследуемых пациентов снижение ИЛ-2 выявлялось в меньшей степени. Угнетение выработки ИЛ-2 было более выражено у пациентов I группы, после культивирования клеток с 20% аутологичной сывороткой.

Полученные результаты могут являться подтверждением роли уремических токсинов, в частности п-крезола, в подавлении активации Т-лимфоцитов хелперов, так как при активации они продуцируют важнейший фактор роста Т-лимфоцитов - ИЛ-2, который необходим как для клеточной пролиферации, так и для их защиты от апоптоза (табл.1).

Таким образом, показано снижение количественных и функциональных показателей, характеризующих активность Т-клеточного иммунитета у больных I группы, с большим содержанием в сыворотках п-крезола. У пациентов II группы эти изменения были менее выраженными.

Состояние гуморального иммунитета оценивалось по абсолютному содержанию в крови В-лимфоцитов CD19+, а также по количеству иммуноглобулинов в сыворотках больных I и II групп. У пациентов I группы были зарегистрированы более низкие показатели абсолютного содержания В-лимфоцитов ( $131 \pm 52$  кл/мкл), по

сравнению со здоровыми донорами, а также с больными ХПН II группы. У последних эти показатели были выше и составляли  $210 \pm 55$  кл/мкл.

При исследовании концентрации сывороточных иммуноглобулинов, у больных I группы выявлялось снижение концентрации иммуноглобулинов класса G ( $IgG - 7,0 \pm 0,5$  г/л), по сравнению с возрастными нормами. У некоторых больных из этой группы, выявлялось снижение концентрации Ig A и IgM. В сыворотках больных II группы показатели содержания иммуноглобулинов-IgG, Ig A и IgM, не снижались, по сравнению с возрастными нормами (табл. 1). Как видно из таблицы, у больных I группы, с повышенной концентрацией п-крезола в сыворотке, наблюдается изменение функциональной активности гуморального иммунитета, проявляющееся снижением выработки IgG, IgA и IgM. Полученные результаты согласуются с данными J.T. de Carvalho и соавт., которые считают, что увеличение содержания п-крезола в крови сопровождается возникновением инфекционного процесса у больных с ХПН [53].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе настоящего исследования данные позволяют предположить, что уремический токсин п-крезол, является неблагоприятным прогностическим фактором возникновения инфекционных осложнений у больных с терминальной ХПН. ■

### Резюме:

В последние годы внимание исследователей сконцентрировалось на исследовании уремического токсина пара-крезола. Известно, что большие концентрации п-крезола бывают на фоне инфекционного процесса у больных с терминальной ХПН. Мы поставили перед собой задачу провести изучение состояния иммунитета у больных с терминальной ХПН. Мы поставили перед собой задачу провести изучение состояния иммунитета у больных с терминальной ХПН.

Больные были разделены на две группы. I группа включала 6 больных с наличием гнойного воспалительного процесса в области судистого доступа, во II группе из 7 человек не было гнойных осложнений. В качестве контрольной группы были взяты здоровые лица. У всех групп больных определялась концентрация пара-крезола в крови. В I группе больных с большим содержанием пара-крезола в крови, на фоне повышенной неспецифической воспалительной активности лейкоцитов наблюдалось снижение их функциональной активности, снижение количественных и функциональных показателей, характеризующих активность. При исследовании клеточного иммунитета отмечено снижение количественных и функциональных показателей, характеризующих активность Т-клеточного иммунитета у больных I группы. У пациентов II группы эти изменения были менее выраженными.

У пациентов I группы были зарегистрированы более низкие показатели абсолютного содержания В-лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами, а также с больными ХПН II группы. При исследовании концентрации сывороточных иммуноглобулинов у больных I группы выявлялось снижение концентрации иммуноглобулинов класса G по сравнению с возрастными нормами. На основании результатов проведенной работы, можно предположить, что существует взаимосвязь между увеличением в крови больных с ХПН концентрации уре-мического токсина п-крезола и снижением функциональной активности врожденного Т-клеточного и гуморального иммунитета.



**Ключевые слова:** хроническая почечная недостаточность, уремические токсины, пара-крезол, иммунитет.

**Key words:** chronic kidney disease, uremic toxins, para-cresol, immunity.

## ЛИТЕРАТУРА

- Wen CP, Cheng TY, Tsai MK, Chang YC, Chan HT, Tsai SP, Chiang PH, Hsu CC, Sung PK, Hsu YH, Wen SF. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: A prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. // *Lancet*. 2008. Vol. 371, N 9631. P. 2173–2182.
- Drey N, Roderick P, Mullee M, Rogerson M. A population-based study of the incidence and outcomes of diagnosed chronic kidney disease. // *Am J Kidney Dis*. 2003. Vol. 42, N 4. P. 677–684.
- Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. // *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008. Vol. 3, N 5. P. 1526–1533.
- Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. // *J Am Soc Nephrol*. 2006. Vol. 17, N 7. P. 2034–2047.
- Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. // *N Engl J Med*. 2007. Vol. 357, N 13. P. 1316–1325.
- Haag-Weber M, Hörl WH. Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia. // *Semin Nephrol*. 1996. Vol. 16, N 3. P. 192–201.
- Chonchol M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. // *Semin Dial*. 2006. Vol. 19, N 4. P. 291–296.
- James MT, Laupland KB, Tonelli M, Manns BJ, Culleton BF, Hemmelgarn BR. Risk of bloodstream infection in patients with chronic kidney disease not treated with dialysis. // *Arch Intern Med*. 2008. Vol. 168, N 21. P. 2333–2339.
- Sarnak MJ, Jaber BL. Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. // *Kidney Int*. 2000. Vol. 58, N 4. P. 1758–1764.
- Eleftheriadis T, Antoniadis G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I. Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. // *Semin Dial*. 2006. Vol. 19, N 5. P. 440–451.
- Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. // *Clin Biochem*. 2011. Vol. 44, N 14–15. P. 1189–1198.
- Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, Siamopoulos KC, Tsakiris D. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. // *Am J Kidney Dis*. 2006. Vol. 48, N 5. P. 752–760.
- Morena M, Cristol JP, Senecal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B. Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? // *Kidney Int Suppl*. 2002. N 80. P. 109–114.
- Rodriguez-Ayala E, Anderstam B, Suliman ME, Seeberger A, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P. Enhanced RAGE-mediated NFκB stimulation in inflamed hemodialysis patients. // *Atherosclerosis*. 2005. Vol. 180, N 2. P. 333–340.
- Stinghen AE, Buchares S, Riella MC, Pecoits-Filho R. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease. // *Blood Purif*. 2010. Vol. 29, N 2. P. 114–120.
- Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. // *Kidney Int*. 2002. Vol. 62, N 5. P. 1524–1538.
- Gollapudi P, Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND. Leukocyte toll-like receptor expression in end-stage kidney disease. // *Am J Nephrol*. 2010. Vol. 31, N 3. P. 247–254.
- Okamura DM, Pennathur S, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, Collins S, Febbraio M, Heinecke J, Eddy AA. CD36 regulates oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic CKD. // *J Am Soc Nephrol*. 2009. Vol. 20, N 3. P. 495–505.
- Rutkowski P, Malgorzewicz S, Słominska E, Renke M, Lysiak-Szydłowska W, Swierczyński J, Rutkowski B. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. // *J Ren Nutr*. 2006. Vol. 16, N 3. P. 190–193.
- Galli F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. // *Nephrol Dial Transplant*. 2007. Vol. 22, Suppl. 5. P. 20–36.
- Yilmaz MI, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Stenvinkel P. Low-grade inflammation in chronic kidney disease patients before the start of renal replacement therapy: Sources and consequences. // *Clin Nephrol*. 2007. Vol. 68, N 1. P. 1–9.
- Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: An epidemiologic perspective. // *Kidney Int*. 2006. Vol. 70, N 1. P. 26–33.
- Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: A hypothesis proposal. // *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009. Vol. 4, Suppl. 1. P. 49–55.
- Miyamoto T, Carrero JJ, Stenvinkel P. Inflammation as a risk factor and target for therapy in chronic kidney disease. // *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011. Vol. 20, N 6. P. 662–668.
- Cirillo P, Sautin YY, Kanellis J, Kang DH, Gesualdo L, Nakagawa T, Johnson RJ. Systemic inflammation, metabolic syndrome and progressive renal disease. // *Nephrol Dial Transplant*. 2009. Vol. 24, N 5. P. 1384–1387.
- Yao Q, Axelsson J, Stenvinkel P, Lindholm B. Chronic systemic inflammation in dialysis patients: an update on causes and consequences. // *ASAIO J*. 2004. Vol. 50, N 6. P. lii–lvii.
- Wang JG, Hsu YH, Yang CC, Lin CS, Tai DW, Chen JS, Hsiao CW, Chen CF. Neutrophils in acidotic haemodialysed patients have lower intracellular pH and inflamed state. // *Nephrol Dial Transplant*. 2007. Vol. 22, N 9. P. 2613–2622.
- Swain SD, Rohn TT, Quinn MT. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. // *Antioxid Redox Signal*. 2002. Vol. 4, N 1. P. 69–83.
- Chilvers ER, Cadwallader KA, Reed BJ, White JF, Condliffe AM. The function and fate of neutrophils at the inflamed site: prospects for therapeutic intervention. // *J R Coll Physicians Lond*. 2000. Vol. 34, N 1. P. 68–74.
- Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. // *Clin Sci*. 1998. Vol. 94, N 5. P. 461–471.
- Ward RA, Ouseph R, McLeish KR. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. // *Kidney Int*. 2003. Vol. 63, N 1. P. 353–359.
- Filep JG, El Kebir D. Neutrophil apoptosis: A target for enhancing the resolution of inflammation. // *J Cell Biochem*. 2009. Vol. 108, N 5. P. 1039–1046.
- Cohen G, Rudnicki M, Hörl WH. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. // *Kidney Int*. 2001. Vol. 78. P. 48–52.
- Glorieux G, Vanholder R, Lameire N. Uraemic retention and apoptosis: what is the balance for the inflammatory status in uraemia? // *Eur J Clin Invest*. 2003. Vol. 33, N 8. P. 631–634.
- Cohen G, Rudnicki M, Deicher R, Hörl WH. Immunoglobulin light chains modulate polymorphonuclear leukocyte apoptosis. // *Eur J Clin Invest*. 2003. Vol. 33, N 8. P. 669–676.
- Cohen G, Rudnicki M, Walter F, Niwa T, Hörl WH. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. // *J Am Soc Nephrol*. 2001. Vol. 12, N 6. P. 1264–1271.
- Cohen G, Raupachova J, Hörl WH. The uraemic toxin phenylacetic acid contributes to inflammation by priming polymorphonuclear leukocytes. // *Nephrol Dial Transplant*. 2013. Vol. 28, N 2. P. 421–429.
- Hörl WH, Haag-Weber M, Mai B, Massry SG. Verapamil reverses abnormal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and carbohydrate metabolism of PMNL of dialysis patients. // *Kidney Int*. 1995. Vol. 47, N 6. P. 1741–1745.
- Fernandez-Fresnedo G, Ramos MA, Gonzalez-Pardo MC, de Francisco AL, Lopez-Hoyos M, Arias M. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. // *Nephrol Dial Transplant*. 2000. Vol. 15, N 4. P. 502–510.
- Meier P, Dayer E, Blanc E, Wauters JP. Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. // *J Am Soc Nephrol*. 2002. Vol. 13, N 1. P. 204–212.
- Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MC, Watanabe R, Dalboni MA, Manfredi SR, dos Santos OP, Kallas EG, Draibe SA, Cendoroglo M. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. // *Nephrol Dial Transplant*. 2006. Vol. 21, N 1. P. 160–165.
- Soriano S, Martin-Malo A, Carracedo J, Ramirez R, Rodriguez M, Aljama P. Lymphocyte apoptosis: Role of uremia and permeability of dialysis membrane. // *Nephron Clin Pract*. 2005. Vol. 100, N 3. P. 71–C77.
- D'Intini V, Bordoni V, Bolgan I, Bonello M, Brendolan A, Crepaldi C, Gastaldon F, Levin NW, Bellomo R, Ronco C. Monocyte apoptosis in uremia is normalized with continuous blood purification modalities. // *Blood Purif*. 2004. Vol. 22, N 1. P. 9–12.
- Vanholder R, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T. Uremic toxicity: present state of the art. // *Int J Artif Organs*. 2001. Vol. 24, N 10. P. 695–725.
- Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. // *Kidney Int*. 2003. Vol. 63, N 5. P. 1934–1943.
- Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. // *J Am Soc Nephrol*. 2012. Vol. 23, N 7. P. 1258–1270.
- Niwa T. Phenol and p-cresol accumulated in uremic serum measured by HPLC with fluorescence detection. // *Clin Chem*. 1993. Vol. 39, N 1. P. 108–111.
- Синюхин В.Н., Стецюк Е.А., Арзуманов С.В. Роль связанных с белком уремиических токсинов в патогенезе хронической почечной недостаточности. // *Экспериментальная и клиническая урология*. 2013. N 1. С. 30–34.
- Сивков А.В., Синюхин В.Н., Арзуманов С.В., Стецюк Е.А., Коробов Т.А. Уремиические токсины в крови больных с терминальной стадией почечной недостаточности при дисбиозе кишечника. // *Экспериментальная и клиническая урология*/ 2014. N 2. С. 94–97.
- De Looor H, Bammens B, Evenepoel P, De Preter V, Verbeke K. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum. // *Clin. Chem*. 2005. Vol. 51, N 8. P. 1535–1538.
- De Smet R, Van Kaer J, Van Vlem B, De Cubber A, Brunet P, Lameire N, Vanholder R. Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. // *Clin Chem*. 2003. Vol. 49, N 3. P. 470–478.
- Vanholder R, De Smet R, Waterloos MA, Van Landschoot N, Vogeleere P, Hoste E, Ringoir S. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. // *Kidney Int*. 1995. Vol. 47, N 2. P. 510–517.
- de Carvalho J Jr, Dalboni MA, Watanabe R, Peres AT, Goes MA, Manfredi SR, Canziani ME, Cendoroglo GS, Guimarães-Souza N, Batista MC, Cendoroglo M. Effects of spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function. // *Artif Organs*. 2011. Vol. 35, N 2. P. 27–32.
- Laetitia Dou, Claire Cerini, Philippe Brunet, Catherine Guilianelli, Valérie Moal, Georges Grau, Rita De Smet, Raymond Vanholder, José Sampol, Yvon Berland. P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. // *Kidney Int*. 2002. Vol. 62, N 6. P. 1999–2009.
- Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань, Магариф. 1993. 192 с.
- Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов. М. 2001, 56 с.