

© Колесник М.О., Сташевська Н.В., Степанова Н.М., Дріянська В.Є., Руденко А.В.,
Кругліков В.Т., Корніліна О.М., 2014

УДК 616.61-002.3-036.87:616.633.461.2

М. КОЛЕСНИК, Н. СТАШЕВСЬКА, Н. СТЕПАНОВА, В. ДРІЯНСЬКА, А. РУДЕНКО,
В. КРУГЛІКОВ, О. КОРНІЛІНА

ГІПЕРОКСАЛУРІЯ ТА ПОКАЗНИКИ МУКОЗАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ХВОРОБУ НИРОК I-II СТ.: ПІЄЛОНЕФРИТ

M. KOLESNYK, N. STASHEVSKA, N. STEPANOVA, V. DRYYANSKAYA, A. RUDENKO,
V. KRUGLYKOV, O. KORNILINA

HYPEROXALURIA AND BIOMARKERS OF MUCOSAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH RECURRENT PYELONEPHRITIS

ДУ «Інститут нефрології НАМН України, Київ
SI «Institute of Nephrology NAMS of Ukraine»

Ключові слова: рецидивуючий пієлонефрит, мукозальний імунітет, гіпероксалурия, лізоцим, лактоферин, секреторний імуноглобулін А.

Keywords: recurrent pyelonephritis, mucosal immunity, hyperoxaluria, lysozyme, lactoferrin, secretory immunoglobulin A.

Резюме. Метою роботи було провести порівняльний аналіз показників мукозального імунітету сечі та слини хворих на хронічний рецидивуючий пієлонефрит залежно від наявності гіпероксалурії.

Матеріал та методи. До обсерваційного одномоментного дослідження включено 40 хворих на хронічний рецидивуючий пієлонефрит жіночої статі, віком від 21 до 48 років ($31,6 \pm 7,7$). Залежно від наявності гіпероксалурії (екскреція оксалатів з сечею більше 0,45 ммоль за добу) пацієнток було розподілено на II групи: до I ($n=29$) включено жінок з гіпероксалурією, до II ($n=11$) – увійшли хворі з нормальним рівнем екскреції оксалатів ($78,2 \pm 28,4$ проти $43,8 \pm 5,2$; $p < 0,001$). Стан мукозального імунітету оцінювали шляхом визначення вмісту лізоциму, лактоферину, секреторного імуноглобуліну А (sIg A) та фактору некрозу пухлини альфа (ФНП- α) у зразках сечі та вмісту sIg A й антитіл класу sIg A до ліпополісахариду (ЛПС) грамнегативних бактерій (анти-ЛПС-sIgA) у слині.

Результати. Визначено достовірно вищий рівень sIg A та анти-ЛПС-sIgA у слині хворих на рецидивуючий пієлонефрит з гіпероксалурією (298 ± 104 проти $150,1 \pm 79,3$ мг/л; $p < 0,001$) та ($0,353 \pm 0,16$ проти $0,211 \pm 0,09$ УООШ; $p < 0,001$), відповідно. У сечі жінок I групи встановлено статистично значуще підвищення вмісту ФНП- α $44 [16,2-130,5]$ проти $21 [14,2-345]$ нг/мл ($p=0,04$) та лізоциму $14,0 [2,5-36,5]$ проти $1,45 [0,12-7,5]$ нг/мл ($p=0,002$). Усі досліджувані показники (анти-ЛПС-sIgA у слині та sIg A, лактоферин й лізоцим сечі) мали прямий кореляційний зв'язок з рівнем добової екскреції оксалатів.

Висновки. Визначену гіперпродукцію показників мукозального імунітету можна пояснити формуванням дисбіозу кишківника під впливом постійної антибактеріальної терапії. Дисбаланс мікрофлори кишківника, у свою чергу, порушує метаболізм оксалатів з формуванням гіпероксалурії, викликає включення механізмів системного та локального імунітету, підвищуючи синтез антитіл до ЛПС, sIg A, лактоферину та лізоциму.

Summary: The aim of our study was to compare the performance of mucosal immunity in urine and saliva of patients with chronic recurrent pyelonephritis subject to availability of hyperoxaluria.

Material and methods. To observational cross-sectional study included 40 women with chronic recurrent pyelonephritis, aged 21 to 48 years (31.6 ± 7.7). Depending on the availability hyperoxaluria (oxalate excretion in the urine than 0.45 mmol per day) patients were divided into II Groups: for I ($n=29$) included women with hyperoxaluria, to II ($n=11$) - includes patients with normal excretion oxalate (7.2 ± 2.4 vs 43.8 ± 5.2 ; $p < 0.001$). State of mucosal immunity was assessed by determining the content of lysozyme, lactoferrin, secretory immunoglobulin A (sIg A) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in urine samples and content sIg A and class antibodies sIg A to lipopolysaccharide (LPS) of gram-negative bacteria (anti-LPS-sIgA) in saliva.

Results. We have identified significantly higher levels of sIg A and anti-LPS-sIgA in the saliva of patients with recurrent pyelonephritis with hyperoxaluria (298 ± 104 vs 150.1 ± 79.3 mg / l, $p < 0.001$) and (0.353 ± 0.16 vs 0.211 ± 0.09 , $p < 0.001$), respectively. In the urine of women of group I we have found a statistically significant increase in the content of TNF- α $44 [16.2-130.5]$ vs $21 [14.2-3.45]$ pg/ml ($p=0.04$) and lysozyme $14.0 [2.5-36.5]$ vs $1.45 [0.12-7.5]$ ng/ml ($p=0.002$). All the studied parameters (anti-LPS-sIgA in saliva and sIg A, lactoferrin and lysozyme urine) had a direct correlation with the level of daily oxalate excretion.

Степанова Наталя Михайлівна
nmstep@ukr.net

Conclusions. Overproduction of indicators of mucosal immunity may be explained by the formation of intestinal dysbiosis under the influence of continuous antibiotic therapy. The imbalance of intestinal microflora, in turn, leads to the formation of hyperoxaluria and increases the production of antibodies to LPS, sIg A, lactoferrin and lysozyme.

ВСТУП. Актуальність проблеми рецидивуючої інфекції сечової системи (рІСС) обумовлена, перш за все, її значною поширеністю серед жінок сексуально активного віку [2, 3, 7]. Так, з приводу ІСС у світі щоденно реєструється більше 1,5 мільйонів звернень [7]. Рецидивуючий перебіг захворювання розвивається у 25% жінок, які перенесли гостру ІСС [13]. Під цим терміном розуміють наявність більше двох рецидивів ІСС впродовж півроку або більше трьох загострень протягом року [7, 13].

Одним із важливих патогенетичних механізмів розвитку рІСС є зміни в імунологічній реактивності організму, серед яких порушенням мукозального імунітету надають особливого значення [12]. Адже шкіра і слизові оболонки є першою лінією захисту проти інфекційних агентів, що перешкоджає проникненню мікроорганізмів у сечову систему [12, 16]. Основу місцевого імунітету слизових оболонок забезпечують численні клітинні та гуморальні фактори. Клітинні фактори включають фагоцити (моноцити, макрофаги, нейтрофіли) та клітини природної цитотоксичності (природні кілери та деякі субпопуляції моноцитів, макрофагів й нейтрофілів). До гуморальних факторів природної резистентності належать система комплементу, неспецифічні імуноглобуліни, лізоцим, інтерферони, лактоферин, трансферин, опсоніни, фібрoneктин, бета-лізіни, тощо [6, 16]. Гуморальні фактори у комплексі з клітинними формують захисні бар'єри, що забезпечує динамічну рівновагу між макроорганізмом і нормальною мікрофлорою [3, 6].

Гіпероксалурія вважається основним фактором ризику формування оксалатно-кальцієвих конкрементів, які складають близько 75% з усіх ниркових каменів [8, 9]. Рівень екскреції оксалатів з сечею, є ключовим чинником, що визначає насичення організму оксалатом [9, 15]. За нормального харчування щоденне надходження оксалату в організм становить 70-920 мг/добу [11]. Приблизно 50% оксалату метаболізується кишковою флорою (*Oxalobacter formigenes*) і 25% виділяється у незмінному виді [11]. *Oxalobacter formigenes* – анаеробна бактерія, яка бере участь у метаболізмі оксалату кальцію в кишечнику [14]. Ця бактерія у великій кількості присутня у більшості дорослого населення та на 70% зменшує ризик виникнення оксалатних каменів [8, 11].

Результати наших попередніх досліджень визначили значну поширеність (>80%) гіпероксалурії у жінок з рецидивуючим піелонефритом [10]. Логічно було припустити, що довготривалий прийом антибактеріальних лікарських засо-

бів, навіть у профілактичних дозах, порушує видовий та кількісний склад мікробіоти кишечника хворих та призводить до знищення *O. formigenes* і формування гіпероксалурії, що водночас зменшує резистентність до інфікування слизових оболонок патогенними мікроорганізмами.

МЕТОЮ нашої роботи було провести порівняльний аналіз показників мукозального імунітету сечі та слини хворих на хронічний рецидивуючий піелонефрит залежно від наявності гіпероксалурії.

ПАЦІЄНТИ ТА МЕТОДИ. До обсерваційного одномоментного дослідження включено 40 хворих на хронічний рецидивуючий піелонефрит жіночої статі, віком від 21 до 48 років ($31,6 \pm 7,7$).

Критеріями включення пацієнток до дослідження були: наявність клінічних ознак захворювання (дизурія, часте сечовипускання, підвищення температури тіла, відчуття болю та важкості у крестовищевальному куті та інші), лейкоцитурія та бактеріурія.

Критеріями виключення були: відмова хворої від участі у дослідженні, вагітність та період лактації, ознаки обструкції сечової системи, зниження швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) <60 мл/хв.

Залежно від наявності гіпероксалурії (екскреція оксалатів з сечею більше 0,45 ммоль за добу) [15] пацієнток було розподілено на II групи: до I (n=29) включено жінок з гіпероксалурією, до II (n=11) – увійшли хворі з нормальним рівнем екскреції оксалатів ($78,2 \pm 28,4$ проти $43,8 \pm 5,2$; $p < 0,001$). Частота рецидивів піелонефриту протягом року була достовірно вищою у пацієнток I групи – $5,7 \pm 3,7$ проти $3,4 \pm 1,03$ ($p = 0,01$).

Стан мукозального імунітету оцінювали шляхом визначення вмісту лізоциму, лактоферину, секреторного імуноглобуліну А (sIg A) та фактору некрозу пухлини альфа (ФНП- α) у зразках сечі та вмісту sIg A й антитіл класу sIg A до ліпополісахариду (ЛПС) грамнегативних бактерій (анти-ЛПС-sIgA) у слині.

Рівні лактоферину та sIg A визначали з використанням імуноферментних (ІФА) тест-систем фірми «Вектор-Бест» (Росія), вміст лізоциму – з використанням ІФА-набору фірми «Immunodiagnostik» (Німеччина). ФНП- α вивчали за допомогою імуноферментної тест-системи фірми «Procon» (Росія, С-Пб), для дослідження анти-ЛПС-sIgA використовували тест системи, впроваджені лабораторією імунології Кримського державного медичного університету.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програм «Statistica

10.0» та «MedCalc», з урахуванням перевірки показників на нормальний розподіл за тестом Колмогорова-Смірнова. За умов нормального розподілу оцінювали середні значення показників (M) та середнє квадратичне відхилення (SD); для їх порівняння використовували критерій Ст'юдента (kS). За невідповідності закону нормального розподілу для опису ознаки застосовували медіану (Me) та інтерквартильний розмах (Q25-Q75); для порівняльного аналізу застосовували непараметричний (U-критерій) Манна-Уїтні. Кореляційний зв'язок визначали за методом Спірмена (ρ) [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Аналіз вмісту загального sIg A та анти-ЛПС-sIgA у слині хворих на рецидивуючий пієлонефрит продемонстрував їх достовірно вищий рівень у жінок з гіпероксалурією (298 ± 104 проти $150,1 \pm 79,3$ мг/л; $p < 0,001$) та ($0,353 \pm 0,16$ проти $0,211 \pm 0,09$ УООЩ; $p < 0,001$), відповідно (рис. 1, 2).

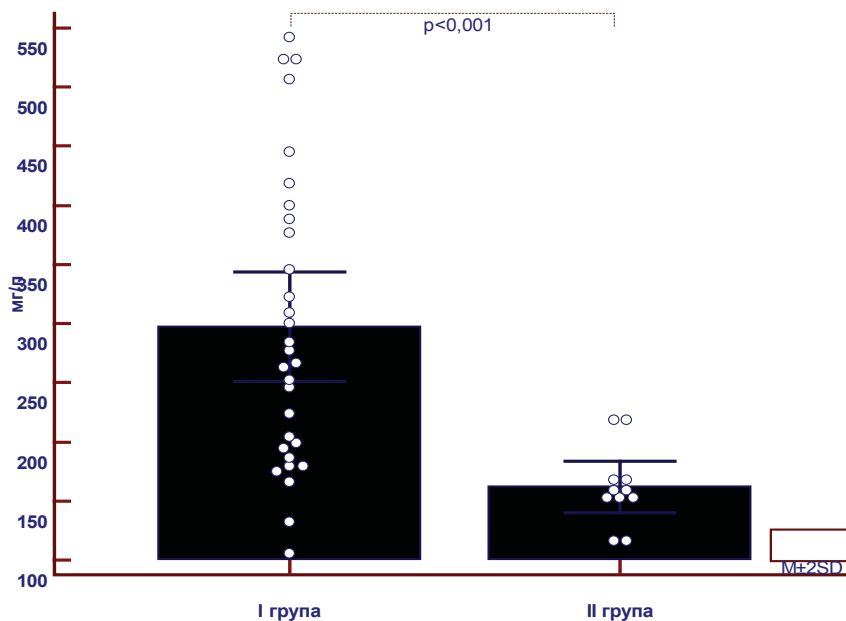


Рис. 1. Вміст sIg A у слині хворих на рецидивуючий пієлонефрит залежно від наявності гіпероксалурії.

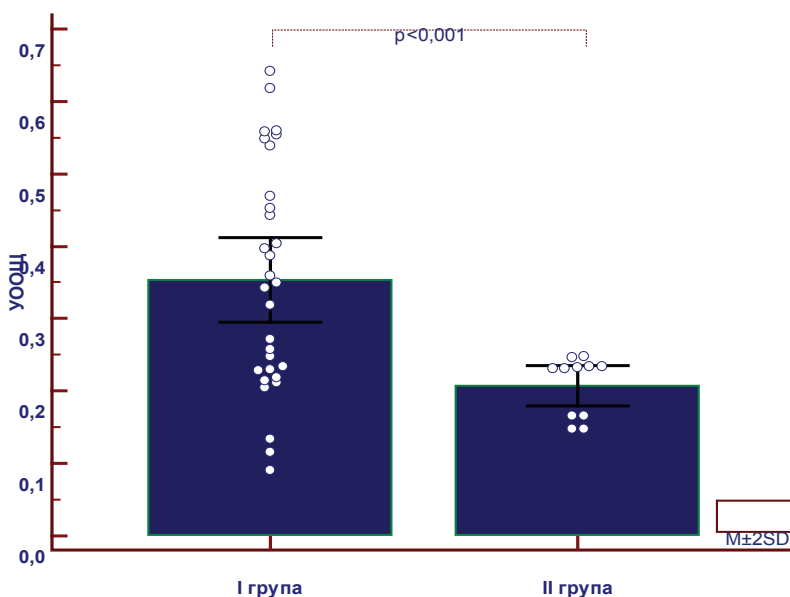


Рис. 2. Вміст анти-ЛПС-sIg A у слині хворих на рецидивуючий пієлонефрит залежно від наявності гіпероксалурії.

Крім того, вміст загального sIg A у слині мав достовірний прямий кореляційний зв'язок з кількістю рецидивів пієлонефриту; чим частіше відбувались рецидиви, тим вищою була концентрація sIg A ($R=0,49$; $p=0,003$) (рис. 3).

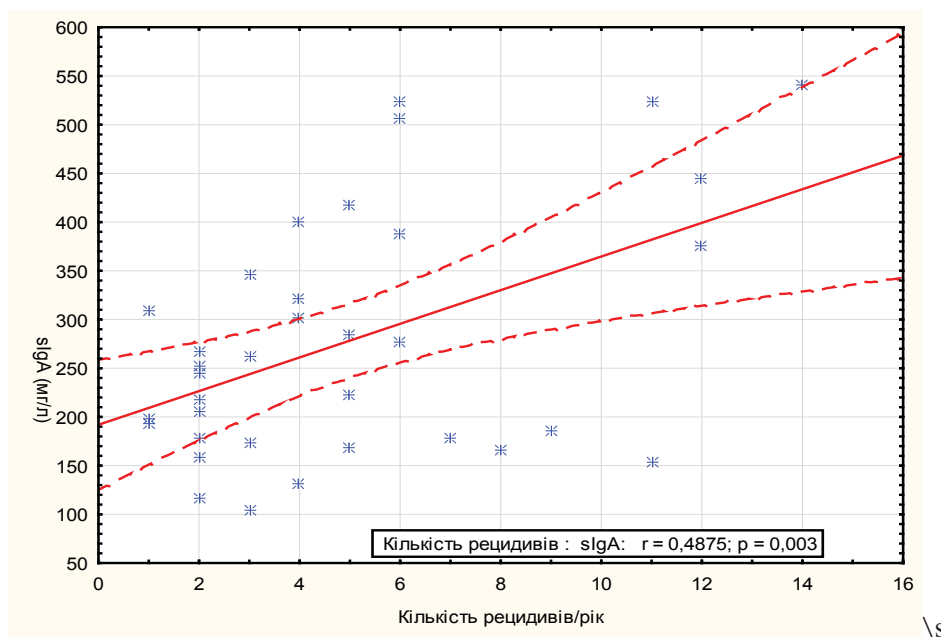


Рис. 3. Кореляційний зв'язок між концентрацією загального sIg A у слині хворих на пієлонефрит та частотою рецидивів захворювання.

Вміст анти-ЛПС-sIg A, у свою чергу, мав прямий сильний кореляційний зв'язок з концентрацією оксалатів у сечі ($p < 0,001$). Тобто, чим вищою була концентрація оксалатів у сечі, тим більшим був вміст анти-ЛПС-антитіл у слині хворих (рис. 4).

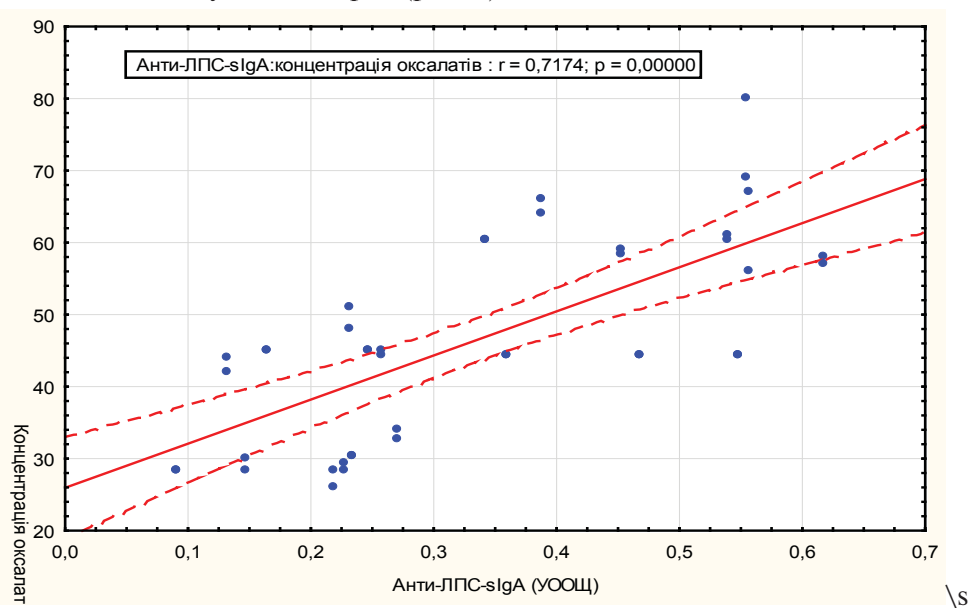


Рис. 4. Взаємозв'язок між вмістом антитіл класу sIg A до ліполісахариду у слині хворих на рецидивуючий пієлонефрит та концентрацією оксалатів у сечі.

sIg A синтезується мукозальним епітелієм та відіграє важливу роль у формуванні механізмів місцевої резистентності, протидіє масованому надходженню антигенів через слизові оболонки, перешкоджає адгезії бактерій, нейтралізує ентеротоксини, сприяє фагоцитозу [6]. Визначену гіперпродукцію sIg A у хворих з гіпероксалурією можна розцінити як компенсаторно-приспосувальну реакцію слизової оболонки на довгостроково існуючий антигенний стимул, а саме персистенцію патогенної мікрофлори.

Відомо, що рівень антитіл до ЛПС грамнегативних бактерій у слині корелює з кількісними і видовими змінами складу мікрофлори кишківника, зокрема з підвищенням вмісту умовно-патогенних ентеробактерій і, певною мірою, відображає ступінь вираженості місцевого запального процесу [1]. Саме тому можна припустити найбільший ступінь дисбіозу кишківника у хворих на рецидивуючий пієлонефрит з гіпероксалурією.

Наступним етапом нашої роботи був порівняльний аналіз рівню ФНП- α у сечі обстежених пацієнток. ФНП- α звернув нашу увагу, оскільки є основним медіатором запалення у відповідь на інфекцію, який синтезується В- і Т-лімфоцитами, НК-клітинами та моноцитами/макрофагами саме у вогнищі запалення [4].

ФНП- α транскрибується у відповідь на різні стимулятори, включаючи ентеротоксин, гриби, віруси, у т.ч. й ендотоксин [4, 6].

Встановлено статистично значуще підвищення вмісту ФНП- α у сечі хворих з гіпероксалурією 44 [16,2-130,5] проти 21 [14,2-345] пг/мл ($p=0,04$) (рис. 6).

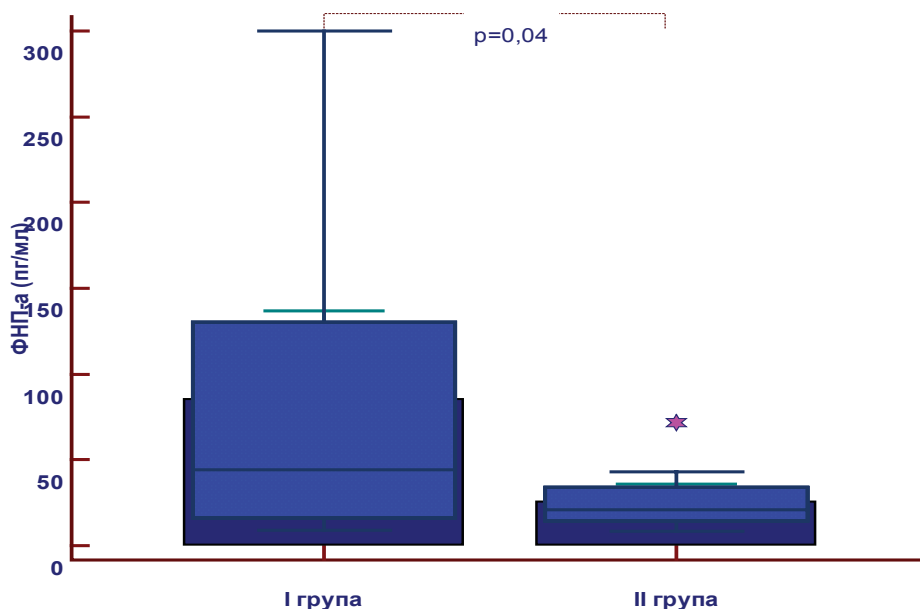


Рис. 6. Вміст ФНП- α у сечі хворих на рецидивуючий пієлонефрит залежно від наявності гіпероксалурії.

Вдвічі більший рівень ФНП- α у сечі хворих I групи може бути пов'язаний як, безпосередньо, з інфекційним навантаженням, так і з модулюючою дією ангіотензину II на ФНП- α -залежні механізми, що ведуть до ренального фіброзу [2, 4].

Аналіз гуморальної ланки мукозального імунітету за показниками sIg A, лізоциму та лак-

тоферину сечі визначив їх достовірний прямий кореляційний зв'язок з рівнем добової екскреції оксалатів (табл. 1). Тобто, чим більшим був рівень екскреції оксалатів, тим вищими були концентрації досліджуваних гуморальних факторів імунітету.

Таблиця 1

Сила кореляційного зв'язку між рівнем добової екскреції оксалатів та гуморальними факторами імунітету, визначених у зразках сечі хворих на рецидивуючий пієлонефрит

Досліджуваний показник	Коефіцієнт Спірмену (ρ)	95% ДІ для ρ	p
sIg A	0,37	0,07 – 0,61	0,001
Лізоцим	0,5	0,23 – 0,7	0,0009
Лактоферин	0,38	0,07 – 0,62	0,001

Крім того, у сечі хворих I групи встановлено достовірно вищу концентрацію лізоциму у порівнянні з пацієнтами II групи – 14,0 [2,5-36,5] проти 1,45 [0,12-7,5] нг/мл (рис. 5).

Лізоцим виконує роль модулятора імунологічних реакцій, найважливішою функцією якого

є імунологічний контроль біоценозу середовища. Підвищення активності лізоциму у хворих на пієлонефрит з гіпероксалурією, на нашу думку, пов'язано з його посиленням синтезом макрофагами та клітинами епітелію сечової системи під впливом персистуючої бактеріальної інфекції.

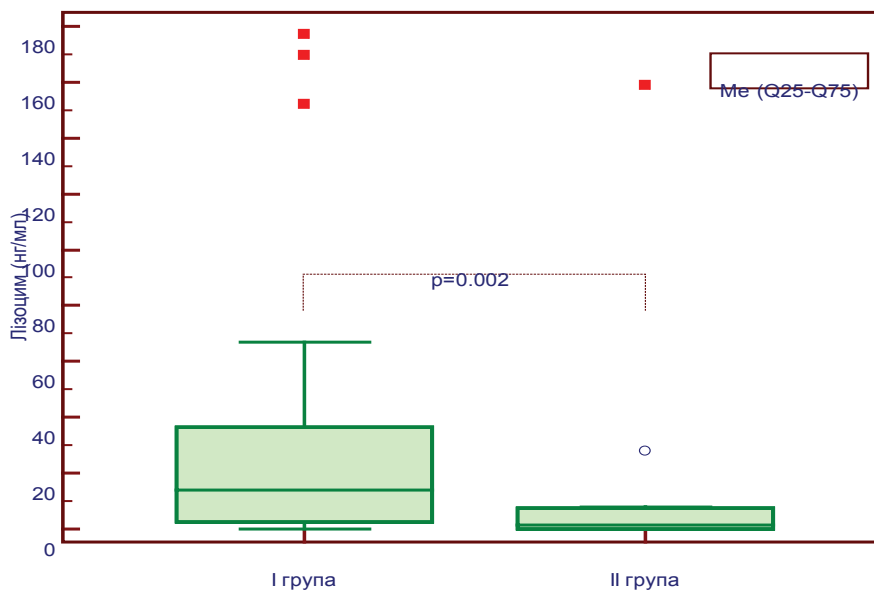


Рис. 5. Концентрація лізоциму сечі залежно від наявності гіпероксалурії у хворих на рецидивуючий пієлонефрит.

ВИСНОВКИ. У хворих на хронічну хворобу нирок I-II ст.: пієлонефрит з рецидивуючим перебігом та гіпероксалурією спостерігалось статистично значуще підвищення синтезу загального sIg A та антитіл до ЛПС грамнегативних бактерій у сліні ($p < 0,001$), достовірно вища концентрація ФНП- α ($p = 0,04$) і лізоциму ($p = 0,002$) у сечі. Усі досліджувані показники (анти-ЛПС-sIg A у сліні та sIg A, лактоферин й лізоцим сечі) мали прямий кореляційний зв'язок з рівнем добової екскреції оксалатів.

Визначену гіперпродукцію показників мукозального імунітету можна пояснити формуванням дисбіозу кишківника під впливом постійної антибактеріальної терапії. Адже, часте рецидивування пієлонефриту, з відповідною необхідністю застосування антибактеріального лікування, призводить до дисбіозу кишечника. Дисбаланс мікрофлори кишківника, у свою чергу, порушує метаболізм оксалатів з формуванням гіпероксалурії, викликає включення механізмів системного та локального імунітету, підвищуючи синтез антитіл до ЛПС, sIg A, лактоферину та лізоциму.

Подальші дослідження необхідні з метою визначення можливих причин гіперпродукції зазначених показників мукозального імунітету у хворих на пієлонефрит з гіпероксалурією.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Алекушина А.В. Комплексний спосіб діагностики вираженості дисбактеріоза кишечника / А.В. Алекушина // Клин. лаб. диагн. – 2010. – № 11. – С. 48–51.
2. Колесник М. О. Патогенез пієлонефриту : що ми знаємо і що ні / М. О. Колесник, Н. М. Степанова, В. Є. Дряньська, А. В. Руденко, Н. А. Калініна, В. Т. Кругліков // Український журнал нефрології та діалізу. – 2011. - № 3 (31). – С. 34-46.
3. Нормальна мікрофлора уrogenітального тракту та її роль у підтриманні імунітету слизових оболонок / О. С. Воронкова, О. А. Сірокваша, Т. М. Полішко, А. І. Вінніков // Вісник Дніпропетровського університету. – Біологія. Екологія. – 2008. – Вип. 16, т. 1. – С. 51–56.
4. Рабсон Л. Основы медицинской иммунологии: пер. с англ. / Л. Рабсон, А. Ройт, П. Делвиз. - М.: Мир, 2006. – 320 с.
5. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: Медиасфера, 2003. – 312 с.
6. Bordon Yvonne. Mucosal immunology: A wee immune response / Bordon Yvonne [Електронний ресурс] // Nature Reviews Immunology. – 2013. – Vol. 13. – Режим доступу : <http://www.nature.com/nri/journal/v13/n4/full/nri3426.html>
7. Guidelines on Urological Infections // M. Grabe (Chairman), M. C. Bishop, T. E. Bjerklund-Johansen [et al.] // European Association of Urology. – 2013.
8. Hatch M. Intestinal transport of an obdurate anion: oxalate / Hatch M., Freel R/ W. // Urol. Res. – 2005. – Vol. 33. – P. 1-16.
9. Hatch M. The Roles and Mechanisms of Intestinal Oxalate Transport in Oxalate Homeostasis / M. Hatch, R. W. Freel // Seminars in Nephrology. – 2008 – Vol 28. – № 2. – P. 143-151.
10. Kolesnyk M. Effect of hyperoxaluria on the progression of chronic kidney disease in women with recurrent uncomplicated pyelonephritis / M. Kolesnyk, N. Stepanova, L. Surzhko, N. Stashevska // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2012. – Vol. 27 (Supplement 2). – P. 107.
11. Lieske J. C. Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria / Lieske J. C., Goldfarb D. S., De Simone C., [et al.] // Kidney Int. – 2005/ - Vol. 68. – P. 1244-1249.

12. Principles of mucosal immunology / Phillip D. Smith et al. – Garland Science, 2013. – 529 p.
13. Raheela Mohsin. Recurrent urinary tract infections in females / Raheela Mohsin, Khurram Mutahir Siddiqui // J Pak Med Assoc. – 2010. – Vol. 60. – No. 1. – P. 55-59.
14. Sensitivity of Human Strains of Oxalobacter formigenes to Commonly Prescribed Antibiotics / J. N. Lange, Kyle D. Wood, H. Wong, R. Otto, [et al.] // Urology. – 2012. – Vol. 79(6). – P.1286-1289.
15. *Stef Robijn*. Hyperoxaluria: a gut–kidney axis? / Stef Robijn, Bernd Hoppe, Benjamin A Vervaeet, Patrick C D’Haese et al // Kidney International. – 2011. – № 80. – P. – 1146–1158.
16. *Williams A*. Immunology : mucosal and body surface defences / Andrew Williams, Tracy Hussell, Clare Lloydby. – Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2012. – 398 p.

Надійшла до редакції 15.05.2014

Прийнята до друку 23.06.2014