

РОЛЬ ВТОРИЧНОГО ГИПЕРПАРАТИРЕОЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ ИММУНОДЕФИЦИТА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ГЕМОДИАЛИЗЕ

М. Осиков, доктор медицинских наук, профессор,

О. Гизингер, доктор биологических наук,

Д. Черепанов

Южно-Уральский государственный медицинский
университет Минздрава России, Челябинск

E-mail: ogizinger@gmail.com

Исследованы наличие и характер связи между уровнем паратиреоидного гормона (ПТГ), показателями фосфорно-кальциевого гомеостаза и гибели лимфоцитов у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), находящихся на гемодиализе. Лабораторно подтверждена взаимосвязь лимфоцитопении у больных с ХПН и активации гибели лимфоцитов вследствие некроза и апоптоза. Доказано, что увеличение в кровотоке количества лимфоцитов с признаками некроза и апоптоза нарастает по мере увеличения концентрации в плазме ПТГ и фосфатов и снижения концентрации общего кальция.

Ключевые слова: хроническая почечная недостаточность, лимфоциты, паратиреоидный гормон, кальций, фосфаты.

Синдром хронической почечной недостаточности (ХПН) – важная проблема современного здравоохранения, поскольку с ним связаны негативные последствия для здоровья и чрезвычайно высокие затраты на оказание медицинской помощи [1]. При ХПН наблюдаются глобальные изменения гомеостаза, функции органов и систем, приводящие к широкому спектру осложнений, определяющих качество и продолжительность жизни больных данной категории, эффективность базисной терапии [2, 3, 7]. Ключевое место в структуре осложнений при ХПН занимают заболевания инфекционного, воспалительного генеза и атеросклерозобусловленная патология, патогенез которых напрямую обусловлен изменениями иммунного статуса [8, 10, 12]. По данным Российского регистра заместительной почечной терапии, сопутствующие заболевания инфекционного, воспалительного генеза и атеросклерозобусловленная патология встречаются более чем у 47% больных с ХПН, получающих заместительную почечную терапию. В структуре летальности больных с ХПН, находящихся на гемодиализе (ГД), инфекционные осложнения занимают 2-е место после кардиоваскулярной патологии, обусловленной преимущественно прогрессированием атеросклероза [1]. Для оптимизации правил выбора медицинских технологий, совершенствования методов диагностики, профилактики и терапии соответствующих осложнений необходимо уточнить патогенез изменений иммунного статуса при ХПН [2, 3].

Ранее нами с использованием методов регрессионного анализа продемонстрировано наличие связи между частотой возникновения заболеваний инфекционного и воспалительного генеза у больных с ХПН, находящихся на заместительной терапии в отделении ГД Челябинской областной клинической больницы, и количеством лимфоцитов в периферической крови [4–6]. Известно, что ведущим фактором развития лимфоцитопении при ХПН является активация гибели лимфоцитов в периферической крови вследствие апоптоза и некроза, однако до сих пор не достигнуто консенсуса в понимании фактора, инициирующего эти процессы; на его роль претендуют азотемия, нарушение обмена витамина D, железа, анемия, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, гемодиализная процедура и др. [9]. Полагаем, что определенный вклад в снижение количества лимфоцитов в крови могут вносить изменения в организме, связанные с развитием вторичного гиперпаратиреоза и сопряженных с ним изменений фосфорно-кальциевого гомеостаза.

Нами изучены наличие и характер связи между уровнем паратиреоидного гормона (ПТГ), показателями фосфорно-кальциевого гомеостаза и показателями гибели лимфоцитов у больных с ХПН, находящихся на ГД.

Для реализации поставленной цели использована кровь людей с терминальной стадией ХПН – пациентов отделения ГД Челябинской областной клинической больницы и отделения ГД Медицинского центра Лотос (Челябинск). Первоначально обследованы 150 больных с терминальной стадией ХПН, получающих гемодиализную терапию на аппаратах Искусственная почка 4008S/VIBAG фирмы Fresenius (Германия) 3 раза в неделю в течение 4 ч. В исследование не включали больных: после трансплантации почки; с наличием на момент исследования гнойно-септических осложнений; с наличием увеличенных лимфатических узлов любой локализации; принимающих глюкокортикостероидную и (или) цитостатическую терапию; со злокачественными и доброкачественными опухолями любой локализации; с ВИЧ-инфекцией, гепатитами С и В; с аутоиммунными и (или) аллергическими заболеваниями. После рандомизации в исследование включены 53 больных (25 женщин, 28 мужчин в возрасте от 24 до 79 лет; средний возраст – 54,09±1,66 года); индекс диализной дозы (Kt/v) – 1,47±0,04. От всех больных получено письменное информированное согласие на участие в исследовании, план которого одобрен этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета Минздрава России. 1-я группа (контроль; n=12) представлена клинически здоровыми добровольцами, не имеющими соматической патологии; 2-я группа – больные с ХПН, получающие лечение ГД (n=53). Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Кровь для исследований забирали из артериального колена артериовенозной фистулы. Количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу определяли общепринятыми методами и выражали в абсолютных ($\cdot 10^9/\text{л}$) величинах. Лимфоциты из периферической крови выделяли на двойном градиенте плотности фикокол-

ла и урографина (ДНК-технология, Россия, плотность – 1,077), концентрацию лимфоцитов в суспензии доводили до $3 \cdot 10^6/\text{л}$. Популяционный и субпопуляционный спектры лимфоцитов в крови определяли иммунофенотипированием методом моноклональных антител серии ICO (НИИ Препарат, Нижний Новгород). Проводили типирование В-лимфоцитов (CD20⁺), НК-клеток (CD16⁺), Т-лимфоцитов (CD3⁺) и их основных субпопуляций (CD4⁺ – маркер клеток хелперно-индукторного ряда; CD8⁺ – маркер цитотоксических лимфоцитов). Апоптоз лимфоцитов оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора Annexin 5 – FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клетки с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), клетки с поздними признаками апоптоза и частично некротические клетки (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), клетки с признаками некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+). Результат выражали в %. Концентрацию ПТГ (нг/л) определяли методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы фирмы Biomerica (США), концентрацию фосфатов в плазме – с использованием тест-системы фирмы Вектор-бест методом без депротеинизации с молибденовокислым аммонием, концентрацию общего кальция в плазме – с использованием тест-системы фирмы Sormap (Польша) методом с о-крезолфталеинкомплексом. Статистический анализ проведен с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. Для оценки различий между группами использовали критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса, для установления связей между показателями – коэффициент корреляции Спирмена; различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Популяционный спектр лимфоцитов в периферической крови больных с ХПН представлен в табл. 1.

Установлено снижение количества лимфоцитов всех популяций в сравнении с таковым в группе контроля: эф-фекторов клеточного иммунитета (CD3⁺), в том числе Т-лимфоцитов хелперов (CD4⁺), Т-лимфоцитов цитотоксических (CD8⁺), а также В-лимфоцитов (CD20⁺), естественных киллеров (CD16⁺). Снижение количества в крови ключевых эф-фекторов клеточного и гуморального врожденного иммунитета позволяет констатировать развитие вторичного иммунодефицита у больных исследуемой категории. Следствием депрессии адаптивного звена иммунитета у больных с ХПН является развитие воспалительных процессов разных

Таблица 1
Популяционный спектр лимфоцитов периферической крови у больных с ХПН до и после ГД (M±m)

Показатель, $\cdot 10^9/\text{л}$	1-я группа	2-я группа	
		до ГД	после ГД
CD3 ⁺	1,25±0,07	0,34±0,03*	0,55±0,07*
CD4 ⁺	0,89±0,04	0,25±0,03*	0,38±0,05*
CD8 ⁺	0,74±0,05	0,18±0,02*	0,29±0,03*
CD16 ⁺	0,45±0,05	0,11±0,01*	0,17±0,02*
CD20 ⁺	0,43±0,03	0,11±0,01*	0,16±0,02*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – статистически значимые различия с 1-й группой ($p < 0,05$).

локализации и степени тяжести (инфекции, неспецифические воспалительные процессы, разрушение поврежденных клеток и тканей и т.д.). Патогенез снижения количества лимфоцитов в крови при ХПН является многофакторным и может быть связан с: разрушением клеток в кровотоке в условиях азотемии и накоплением продуктов метаболизма в крови; нарушением лимфопоэза под действием эндогенных токсинов на центральные или периферические органы иммунной системы; дисрегуляцией иммунного ответа в условиях цитокинового дисбаланса; избыточным потреблением лимфоцитов в очаге воспаления или инфекционного поражения и др. Полагаем, что ведущим фактором развития лимфоцитопении является активация гибели лимфоцитов в кровотоке. Показатели гибели лимфоцитов периферической крови у больных с ХПН до ГД представлены в табл. 2.

Установлено, что у больных с ХПН, находящихся на ГД, интактных клеток в периферической крови статистически значимо меньше, чем у здоровых, что связано с увеличением количества лимфоцитов с ранними признаками апоптоза: с фосфолипидной асимметрией цитоплазматической мембраны, презентуемой экспрессией фосфатидилсерина, который связывается с Annexin-5-FITC (Annexin-5-FITC+/7-AAD-). Кроме того, возрастает в 7 раз количество лимфоцитов одновременно с поздними признаками апоптоза и признаками некроза (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), в 5 раз – количе-

ство лимфоцитов с признаками некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+). Таким образом, гибель лимфоцитов у больных с ХПН обусловлена процессами апоптоза и некроза.

Нами установлена связь между количеством лимфоцитов основных популяций в периферической крови и показателями гибели лимфоцитов у больных с ХПН, находящихся на ГД (табл. 3).

Как видим, количество в периферической крови CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺-, CD20⁺-клеток имеет сильную отрицательную связь с признаками раннего апоптоза, позднего апоптоза и некроза, количество CD3⁺-, CD20⁺-клеток – сильную отрицательную связь с признаками некроза. Снижение количества лимфоцитов в крови приводит к дефициту клеточного и гуморального адаптивного иммунитета, дефектам презентации антигенов иммунокомпетентным клеткам и как следствие – к росту заболеваемости и неблагоприятным исходам инфекционной патологии при ХПН. При оценке уровня ПТГ в плазме у больных с ХПН обнаружено его увеличение в 24 раза по сравнению с таковым в группе контроля (табл. 4).

Концентрация общего кальция в плазме статистически значимо снижается, а фосфатов – увеличивается. Следует отметить, что у больных с ХПН в плазме накапливаются карбоксиконцевые фрагменты ПТГ, и определяемый уровень ПТГ оказывается искусственно завышенным, поэтому более

достоверные результаты дает определение интактного ПТГ по 2 фрагментам молекулы. В норме у здоровых людей уровень ПТГ равен 8–76 пг/мл. Эмпирически доказано, что для поддержания процесса ремоделирования кости на нормальном уровне у пациентов с ХПН содержание ПТГ у них должно быть в 2–3 раза выше, чем у здоровых, – 120–200 пг/мл. Оптимальная нижняя граница уровня ПТГ при ХПН неизвестна, а уровень ПТГ не всегда коррелирует с костными изменениями [7].

Корреляционный анализ (табл. 5) выявил отрицательную средней силы связь между количеством в крови интактных клеток (Annexin-5-FITC-/7-AAD-) и уровнем ПТГ и фосфатов в плазме; количество в крови клеток с признаками раннего апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-) напрямую зависит от концентрации в плазме общего кальция и фосфатов; количество клеток с поздними признаками апоптоза и частично – некротических клеток (Annexin-5-FITC+/7-AAD+) имеет положительную связь средней силы с уровнем ПТГ и фосфатов в плазме; количество клеток с признаками некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+)

Таблица 2

Показатели гибели лимфоцитов периферической крови у больных с ХПН (M±m)

Показатели, %	1-я группа	2-я группа (до ГД)
Интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-)	80,83±0,83	68,33±2,17*
Клетки с признаками:		
раннего апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-)	19,06±0,82	31,05±2,12*
позднего апоптоза/некроза (Annexin-5-FITC+/7-AAD+)	0,05±0,01	0,37±0,05*
некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+)	0,06±0,01	0,29±0,04*

Таблица 3

Корреляция между количеством лимфоцитов до ГД и показателями апоптоза лимфоцитов у больных с ХПН; R

Показатель, • 10 ⁹ /л	Ann-5-FITC+/7-AAD-, %	Ann-5-FITC+/7-AAD+, %	Ann-5-FITC-/7-AAD+, %
CD3 ⁺	-0,73	-0,86	-0,68
CD4 ⁺	-0,61	-0,74	-0,44
CD8 ⁺	-0,59	-0,75	-0,31
CD16 ⁺	-0,37	-0,64	-0,23
CD20 ⁺	-0,68	-0,77	-0,53

Примечание. Здесь и в табл. 5: R – коэффициент корреляции Спирмена.

Таблица 4

Концентрация ПТГ, кальция и фосфатов в плазме крови больных с ХПН (M±m)

Показатель	1-я группа	2-я группа (до ГД)
ПТГ, нг/л	19,94±1,69	479,90±60,47
Общий кальций, ммоль/л	4,57±0,21	3,28±0,16
Фосфаты, ммоль/л	0,96±0,05	1,61±0,11

Примечание. Различия между группами значимы при p<0,001.

напрямую зависит от концентрации в плазме ПТГ.

Наибольшее количество статистически значимых корреляционных связей обнаружено между показателями апоптоза и концентрацией в плазме ПТГ и фосфатов. Наличие таких связей может свидетельствовать о роли ПТГ, кальция и фосфатов в изменении функциональной активности лимфоцитов с заинтересованностью внутриклеточных сигнальных путей, опосредующих программы апоптоза и некроза.

Приведенные данные дают основание для следующих выводов:

- у больных с ХПН при исследовании до процедуры ГД в периферической крови снижается количество лимфоцитов, в том числе CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺; лимфоцитоз после процедуры ГД является ложным и обусловлен гемоконцентрацией;
- лимфоцитопения у больных с ХПН, находящихся на ГД, обусловлена, в том числе, активацией гибели лимфоцитов вследствие некроза и апоптоза; по данным корреляционного анализа, снижение количества лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺ в периферической крови у больных с ХПН прогрессирует по мере увеличения количества лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза и частично — с признаками некроза;
- признаками вторичного гиперпаратиреоза у больных с ХПН, находящихся на ГД, являются увеличение концентрации в плазме ПТГ, фосфатов и снижение уровня общего кальция;
- изменение фосфорно-кальциевого гомеостаза у больных с ХПН, находящихся на ГД, вносит определенный вклад в активацию гибели лимфоцитов периферической крови вследствие апоптоза и некроза; увеличение количества в кровотоке лимфоцитов с признаками некроза и апоптоза нарастает по мере увеличения концентрации в плазме ПТГ и фосфатов и снижения концентрации общего кальция.

Литература

1. Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Заместительная терапия больных с хронической почечной недостаточностью методами перитонеального диализа и трансплантации почки в Российской Федерации в 1998–2011 г. Отчет по данным Российского регистра заместительной почечной терапии. Ч. 2 // Нефрология и диализ. – 2014; 16 (2): 192–227.
2. Осиков М.В., Ахматов В.Ю., Кривожижина Л.В. Влияние гемодиализа на процессы свободно-радикального окисления у больных хронической почечной недостаточностью // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Сер.: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2007; 16 (71): 95–7.

Таблица 5

Корреляция между показателями гибели лимфоцитов периферической крови и уровнем ПТГ, кальция и фосфатов в плазме у больных с ХПН; R

Показатель	ПТГ, пг/л	Общий кальций, ммоль/л	Фосфаты, ммоль/л
Интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), %	-0,45	0,23	-0,45
Клетки с признаками:			
раннего апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), %	0,31	0,35	0,64
позднего апоптоза/некроза (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), %	0,46	0,27	0,53
некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+), %	0,54	0,24	-0,39

3. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. и др. Патологические аспекты изменения и коррекции врожденного иммунитета при хронической почечной недостаточности // Современные проблемы науки и образования. – 2013; 5: URL: www.science-education.ru/111-9998 (дата обращения: 09.11.2014).

4. Осиков М.В., Григорьев Т.А., Федосов А.А. Современные представления о гемостазиологических эффектах эритропоэтина // Фундаментальные исследования. – 2013; 5 (1): 196–200.

5. Осиков М.В., Григорьев Т.А., Федосов А.А. Эритропоэтин как регулятор экспрессии тромбоцитарных гликопротеинов // Современные проблемы науки и образования. – 2013; 1: URL: www.science-education.ru/107-7731 (дата обращения: 09.11.2014).

6. Осиков М.В., Агеев Ю.И., Лебедева Ю.В. Прогностическая значимость оценки иммунного статуса у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе // Рос. иммунол. журн. – 2014; 8 (17): 573–5.

7. Руководство по диализу. Пер. с англ. Под ред. А.Ю. Денисова, В.Ю. Шило. 3-е изд. / Тверь: ООО Триада, 2003; 744 с.

8. Betjes M. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease // Nat. Rev. Nephrol. – 2013; 5: 255–65.

9. Cohen G., Hörl W. Immune Dysfunction in Uremia-An Update // Toxins (Basel). – 2012; 4 (11): 962–90.

10. Kato S., Chmielewski M., Honda H. et al. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2008; 3 (5): 1526–33.

11. Owda A., Elhwaier H., Narra S. et al. Secondary hyperparathyroidism in chronic hemodialysis patients: prevalence and race // Ren. Fail. – 2003; 25: 595–602.

12. Stingham A., Buchares S., Riella M. et al. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease // Blood Purif. – 2010; 29 (2): 114–20.

ROLE OF SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM IN THE PATHOGENESIS OF IMMUNODEFFICIENCY IN CHRONIC RENAL FAILURE PATIENTS ON HEMODIALYSIS

Professor M. Osikov, MD; O. Gizinger, Biol. Dr.; D. Cherepanov
South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk

The presence and pattern of a relationship between parathyroid hormone (PTH), phosphorus and calcium hemostatic parameters, and lymphocyte death were studied in chronic renal failure (CRF) patients on hemodialysis. The relationship between lymphocytopenia in CRF patients and activation of lymphocyte death due to necrosis and apoptosis was laboratorily verified. The higher lymphocyte count in blood flow with the signs of necrosis and apoptosis were proven to increase with the higher plasma concentrations of PTH and phosphates and with the lower levels of total calcium.

Key words: chronic renal failure, lymphocytes, parathyroid hormone, calcium, phosphates.