

ПАТОГЕНЕЗ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОГО СТАТУСА И РОЛЬ АМЛОДИПИНА В ИХ КОРРЕКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Осиков М.В., Гизингер О.А., Черепанов Д.А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Цель работы — исследовать некоторые механизмы изменения иммунного статуса и роль блокатора кальциевых каналов амлодипина в их коррекции при экспериментальной хронической почечной недостаточности (ХПН). ХПН у крыс моделировали путем двухэтапной оперативной резекции 5/6 почечной ткани. Амлодипин применяли *per os* ежедневно в дозе 0,25 мг/кг в сутки в течение 7 дней. Методом проточной цитофлуориметрии дифференцировали лимфоциты периферической крови: CD3⁺ (преимущественно Т-лимфоциты), CD45RA⁺ (преимущественно В-лимфоциты), Annexin 5-FITC⁺/7-AAD⁻ (с ранними признаками апоптоза, Annexin 5-FITC⁺/7-AAD⁺ (с поздними признаками апоптоза и частично некротические клетки. В сыворотке определяли концентрацию мочевины, креатинина, фосфатов, общего кальция, паратиреоидного гормона (ПТГ), IL-1β, IL-4, интерферона-γ, активность СОД и каталазы. Оценку Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа проводили соответственно по реакции гиперчувствительности замедленного типа и по количеству антителообразующих клеток в селезенке крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами. В липидном экстракте лимфоцитов периферической крови исследовали содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. Изменения иммунного статуса при ХПН включают депрессию Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа, снижение количества лимфоцитов, несущих маркеры Т- и В-клеток, увеличение концентрации в крови IL-1β, снижение концентрации IFNγ и IL-4. Патогенез изменений иммунного статуса, в том числе, связан с увеличением количества лимфоцитов в периферической крови с ранними и поздними признаками апоптоза, некроза, увеличения концентрации в крови IL-1β, общего кальция, ПТГ, снижения концентрации IFNγ, увеличением количества первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в лимфоцитах периферической крови, угнетением активности СОД и каталазы в плазме. Применение амлодипина приводит к восстановлению Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа, увеличению количества лимфоцитов, несущих маркеры Т- и В-клеток. Механизм иммуотропного действия амлодипина связан со снижением количества лимфоцитов в периферической крови с ранними и поздними признаками апоптоза, признаками некроза, ПОЛ-ограничивающим эффектом в лимфоцитах периферической крови, повышением активности СОД в плазме.

Ключевые слова: амлодипин, иммунный статус, цитокины, апоптоз лимфоцитов, свободно-радикальное окисление, хроническая почечная недостаточность

Адрес для переписки:

Осиков Михаил Владимирович
ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (919) 122-37-99.
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

Address for correspondence:

Osikov Mikhail V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (919) 122-37-99.
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Осиков, О.А. Гизингер, Д.А. Черепанов, «Патогенез изменений иммунного статуса и роль амлодипина в их коррекции при экспериментальной хронической почечной недостаточности» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 231–238.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-231-238

© Осиков М.В. и соавт., 2016

For citation:

M.V. Osikov, O.A. Gizinger, D.A. Cherepanov, "Pathogenesis of immune alterations and corrective role of amlodipine in experimental chronic renal failure", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 231–238. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-231-238

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-3-231-238>

PATHOGENESIS OF IMMUNE ALTERATIONS AND CORRECTIVE ROLE OF AMLODIPINE IN EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL FAILURE

Osikov M.V., Gizinger O.A., Cherepanov D.A.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The purpose of this study was to assess some mechanisms of changes in immune state, and to evaluate a role of amlodipine, a known calcium channel blocker, as a potential corrective drug in experimental chronic renal failure (CRF). An animal CRF model was produced in rats by a two-stage operative resection of 5/6 of the renal tissue. Amlodipine is used *per os* at a daily dose of 0.25 mg/kg for 7 days. Flow cytofluorimetric approach was used to discern peripheral blood lymphocytes: CD3⁺ (mainly, T lymphocytes), CD45RA⁺ (mainly, B cells), as well as the following cell markers: Annexin 5-FITC⁺/7-AAD⁻ (early apoptosis), Annexin 5-FITC⁺/7-AAD⁺ (late apoptosis and, in part, necrotic cells). Moreover, we have measured serum concentrations of urea, creatinine, phosphate, total calcium, parathyroid hormone (PTH), IL-1 β , IL-4, interferon- γ , superoxide dismutase (SOD) and catalase activities. Evaluation of Th1- and Th2-dependent immune response was carried out, respectively, by detection of delayed-type hypersensitivity, and scoring the antibody-forming cells in rat spleen induced by immunization with allogeneic erythrocytes. Primary, secondary and final products of lipid peroxidation were evaluated in lipid extracts from peripheral blood lymphocytes.

Changes of immune state in CRF included depression of Th1 and Th2 dependent immune response, reduced number of lymphocytes bearing T and B cell markers, increased IL-1 β concentrations in blood, along with decreased amounts of IFN γ and IL-4. Probable pathogenesis of the altered immune state may be associated with increased number of peripheral lymphocytes being at early and late stages of apoptosis/necrosis, elevated blood levels of IL-1 β , total calcium, parathyroid hormone, reduced concentrations of IFN γ , and increased contents of primary, secondary and final peroxidation products in peripheral blood lymphocytes, being accompanied by inhibition of the SOD and catalase activity in blood plasma. Amlodipine administration lead to restoration of Th1 and Th2 dependent immune response, increased number of cells positive for T and B lymphocyte markers. Probable immune mechanisms of amlodipine effects may be associated with decreased numbers of apoptotic/necrotic lymphocytes, reduced lipid peroxidation in peripheral blood lymphocytes, enhanced SOD activity in blood plasma.

Keywords: amlodipine, immune state, cytokines, lymphocytes, apoptosis, free radical oxidation, chronic renal failure

Введение

При хронической почечной недостаточности (ХПН) наблюдаются глобальные изменения гомеостаза, приводящие к широкому спектру осложнений, определяющих качество и продолжительность жизни больных, эффективность заместительной терапии. Ключевое место в структуре осложнений занимают заболевания инфекционного, воспалительного генеза, атеросклероз-обусловленная патология. По данным Российского регистра заместительной почечной терапии, они встречаются более чем у 47% больных ХПН [1]. Патогенез сердечно-сосудистой, инфекционной патологии, заболеваний воспалительного генеза у данной категории больных прямо или косвенно связан с дисфункцией иммунной системы в связи с изменением количественного состава, функциональной активности и кооперации между иммунокомпетентными клетками [12, 13]. Ранее нами продемонстрировано изменение активности плазменных протеолитических си-

стем, врожденного и адаптивного иммунитета, клеточной кооперации в крови, регуляции иммунного ответа при ХПН в клинических и в экспериментальных условиях [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Несмотря на большое количество феноменологических данных по изменению иммунного статуса при ХПН, его патогенез до конца не изучен. На роль ведущих патогенетических факторов претендуют гиперазотемия и накопление продуктов метаболизма в крови, активация процессов свободно-радикального окисления, эффекты медиаторов гуморальных регуляторных систем – ренин-ангиотензин-альдостероновой, симпатoadреналовой, нарушения обмена железа, изменения кислотно-основного и водно-электролитного баланса и др. факторы [4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 17]. Одним из механизмов нарушений иммунитета при ХПН может выступать развитие вторичного гиперпаратиреоза и сопутствующие изменения фосфорно-кальциевого гомеостаза. Вторичный гиперпаратиреоз является неременным атрибутом

ХПН и определяет вектор и глубину осложнений в терминальную стадию ХПН. В последние годы внимание многих исследователей сосредоточено на плейотропных эффектах паратиреоидного гормона (ПТГ): регуляции гемопоэза, углеводного и липидного обмена, сосудистого тонуса [21]. Рецепторы для ПТГ представлены на лимфоцитах и фагоцитах, эпителиальных клетках тимуса [25]. Результаты предыдущих исследований позволили продемонстрировать при ХПН в клинических и в экспериментальных условиях связь между изменением концентрации ПТГ, кальция и фосфатов в крови и количественным составом, функциональной активностью иммунокомпетентных клеток [9]. Обнаружено, что повышение концентрации ионизированного кальция, снижение захвата глюкозы, потребления кислорода, концентрации гликогена и активности гликогенсинтетазы в фагоцитах у больных ХПН зависит от концентрации ПТГ в крови [18]. Принимая во внимание увеличение концентрации кальция в цитоплазме иммунокомпетентных клеток как одного из факторов их дисфункции при ХПН, патогенетически обоснованным для коррекции врожденного и адаптивного иммунитета при ХПН может быть применение блокаторов кальциевых каналов. Данные литературы по этому вопросу малочисленны и зачастую противоречивы. Так, верапамил, применяемый 8-9 недель у больных с терминальной ХПН в дозе 120 мг/кг, нифедипин, амлодипин и др. блокаторы кальциевых каналов нормализуют содержание кальция, АТФ и углеводов в цитоплазме, но только частично восстанавливают функцию фагоцитов [20]. Цель работы — исследовать некоторые механизмы изменения иммунного статуса и роль блокатора кальциевых каналов амлодипина в их коррекции при экспериментальной хронической почечной недостаточности.

Материалы и методы

Работа выполнена на 85 белых нелинейных крысах-самцах массой 200-240 г, случайным образом разделенных на 3 группы: I — контрольная, ложнооперированные животные ($n = 25$), II — животные с ХПН ($n = 30$), III — животные, которым на фоне ХПН вводили амлодипин ($n = 30$). ХПН моделировали путем двухэтапной оперативной резекции 5/6 почечной ткани [10]. ХПН развивалась на 21 сутки, для верификации определяли концентрацию в сыворотке креатинина, мочевины. Амлодипин в составе препарата «Амлодипин-Тева» (международное непатентованное название: амлодипин, «Тева», Израиль) вводили животным III группы, начиная с 21 суток эксперимента, в суспензии изотонического раствора натрия хлористого *per os* ежедневно в дозе

0,25 мг/кг в сутки в течение 7 дней, суммарная доза составила 1,75 мг/кг. Животным I и II групп вводили эквивалентное количество стерильного физиологического раствора. Исследования во всех группах проводили на 28 сутки эксперимента. Кровь забирали пункцией левого желудочка сердца под общим ингаляционным наркозом (диэтиловый эфир). Лимфоциты из периферической крови выделяли на двойном градиенте плотности фиколла и урографина, концентрацию клеток в суспензии доводили до 3×10^6 /л. Экспрессию антигенов CD45RA, CD3 на лимфоцитах периферической крови определяли методом прямого иммунофлуоресцентного окрашивания клеток цельной крови на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США) с использованием моноклональных антител CD45RA (клон ОХ-33) — экспрессируется преимущественно на В-лимфоцитах; CD3 (клон 1F4) — экспрессируется преимущественно на Т-лимфоцитах. Апоптоз лимфоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре при окрашивании конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5-FITC/7-AADkit» («Beckman Coulter», США) с дифференцировкой интактных клеток (Annexin 5-FITC⁻/7-AAD⁻), клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin 5-FITC⁺/7-AAD⁻), клеток с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток (Annexin 5-FITC⁺/7-AAD⁺). Концентрацию в сыворотке IL-1 β , IL-4, интерферона- γ проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия) с применением специфических крысиных тест-систем фирмы «Cloud clone» (США). Оценку гуморального иммунного ответа крыс проводили по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у крыс, иммунизированных аллогенными эритроцитами, оценивали по выраженности воспалительного отека стопы. Концентрацию мочевины, креатинина, фосфатов, общего кальция в сыворотке определяли на биохимическом анализаторе «Analette» (США) с применением тест-систем «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), концентрацию ПТГ — на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия) с использованием специфической для крыс тест-системы компании «Cloud clone» (США). Уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в лимфоцитах определяли спектрофотометрически отдельно в гептановой и в изопропанольной фазах липидного экстракта [2]. Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.) — E232/E220 (относительное

содержание диеновых конъюгатов – ДК), E278/E220 (уровень кетодиенов и сопряженных триенов – КД и СТ) и E400/E220 (уровень оснований Шиффа – ШО). О состоянии антиоксидантной защиты судили по активности в плазме СОД [11] и каталазы [3]. Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 8.0. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, отличия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Терминальная стадия ХПН развивается через 20 суток после нефрэктомии, критериями служили повышение в сыворотке концентрации креатинина и мочевины (табл. 1). При ХПН в сыворотке статистически значимо повышается концентрация ПТГ на 80,4%, концентрация общего кальция – на 11,8%, фосфатов – на 19,5%. Гиперфосфатемия, относительный и абсолютный дефицит кальцитриола, кальцидиола занимают центральное место в патогенезе гиперпаратиреоза при ХПН и тесно связаны с эффектами ПТГ.

Показатели иммунного статуса при экспериментальной ХПН представлены в таблице 2. При оценке адаптивного иммунитета у крыс с ХПН выявлено значительное уменьшение интенсивности реакции ГЗТ, что свидетельствует об угнетении Th1-иммунного ответа. Уменьшение количества АОК в селезенке как в абсолютных значениях, так и при пересчете на 10^6 ЯСК свидетельствует о подавлении Th2-зависимого иммунного ответа. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови показало более чем двукратное снижение количества клеток с маркерами преимущественно Т-лимфоцитов (CD3⁺) и клеток с маркерами преимущественно В-лимфоцитов (CD45RA⁺). Отметим преимущественное снижение количества CD3⁺ лимфоцитов над снижением CD45RA⁺. При экспериментальной ХПН изменяется цитокиновый профиль в крови: концентрация IL-1 β в крови статистически значимо увеличивается по сравнению с контрольной группой ложнооперированных животных, концентрация IL-4 и IFN γ статистически значимо снижается.

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ АМЛОДИПИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХПН (M $\pm$ m)

Группы / Показатели	Группа 1 Л/оперир. (n = 15)	Группа 2 ХПН (n = 10)	Группа 3 ХПН + АН (n = 10)
Мочевина, ммоль/л	6,06 $\pm$ 0,51	9,92 $\pm$ 1,13*	8,95 $\pm$ 0,32*
Креатинин, мкмоль/л	100,07 $\pm$ 5,34	161,66 $\pm$ 9,33*	155,03 $\pm$ 6,84*
Кальций общий, ммоль/л	2,21 $\pm$ 0,06	2,47 $\pm$ 0,01*	2,53 $\pm$ 0,02*
Фосфаты, ммоль/л	1,59 $\pm$ 0,06	1,90 $\pm$ 0,13*	1,89 $\pm$ 0,11*
ПТГ, пг/л	79,50 $\pm$ 1,07	143,40 $\pm$ 22,62*	146,00 $\pm$ 22,24*

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с группой 1.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ АМЛОДИПИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХПН (M $\pm$ m)

Показатели	Группа 1 Л/оперир. (n = 15)	Группа 2 ХПН (n = 20)	Группа 3 ХПН + АН (n = 20)
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	3,15 $\pm$ 0,14	1,42 $\pm$ 0,08*	2,90 $\pm$ 0,19 [#]
CD45RA ⁺ , 10 ⁹ /л	2,26 $\pm$ 0,17	1,00 $\pm$ 0,08*	2,18 $\pm$ 0,27 [#]
ГЗТ, мл	0,42 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,02*	0,38 $\pm$ 0,06 [#]
АОК, $\times 10^4$	442,59 $\pm$ 43,87	214,02 $\pm$ 34,00*	369,36 $\pm$ 12,59* [#]
АОК, $\times 10^6$ ЯСК	565,98 $\pm$ 24,66	265,48 $\pm$ 21,30*	692,60 $\pm$ 159,55 [#]
Annexin-5-FITC-/7-AAD ⁻ , % клеток	92,79 $\pm$ 0,88	85,44 $\pm$ 0,78*	95,72 $\pm$ 0,44 [#]
Annexin-5-FITC+/7-AAD ⁻ , % клеток	7,00 $\pm$ 0,85	13,60 $\pm$ 0,71*	3,86 $\pm$ 0,37* [#]
Annexin-5-FITC+/7-AAD ⁺ , % клеток	0,20 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,09*	0,42 $\pm$ 0,08 [#]
IL-1 β , пкг/мл	5,17 $\pm$ 0,41	20,07 $\pm$ 0,93*	19,23 $\pm$ 0,62*
IL-4, пкг/мл	4,25 $\pm$ 0,51	1,89 $\pm$ 0,20*	2,20 $\pm$ 0,14*
IFN γ , пкг/мл	15,52 $\pm$ 1,25	9,65 $\pm$ 0,67*	10,52 $\pm$ 0,87*

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с группой 1, [#] – с группой 2.

Полагаем, что в патогенезе лимфоцитопении, депрессии Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа при ХПН имеют значение угнетение лимфоцитопоэза, увеличение гибели лимфоцитов, повышенное разрушение их в кровотоке. Указанные механизмы реализуются в условиях воздействия на клетки уремических токсинов, развития окислительного стресса, вторичного гиперпаратиреоза и дисбаланса цитокинов в крови.

Выявлено, что при экспериментальной ХПН увеличивается количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻), поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток (Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺), снижается количество клеток без признаков некроза и апоптоза (Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻). С использованием корреляционного анализа установлено наличие связи между количеством в крови CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов и количеством лимфоцитов с ранними признаками апоптоза (соответственно, R = -0,78; R = -0,71; p < 0,05), поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток (соответственно, R = -0,64; R = -0,58; p < 0,05). Повышение концентрации IL-1β в крови может вносить вклад в активацию функциональной активности нейтрофилов и других фагоцитов, генерацию АФК и инициировать активацию ПОЛ мембран лимфоцитов. Принимая во внимание влияние IL-4 и IFNγ на рост и дифференцировку лимфоцитов, снижение их концентрации в крови может вносить вклад в развитие лимфоцитопении и депрессию Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа при ХПН. Выявлена обратная корреляция между концентрацией в крови IL-1β и количеством CD3⁺ (R = -0,49; p < 0,05) и CD45RA⁺ лимфоцитов (R = -0,43; p < 0,05) и прямая корреляция между концентрацией в крови IFNγ и количе-

ством CD3⁺ (R = 0,57; p < 0,05) и CD45RA⁺ лимфоцитов (R = 0,55; p < 0,05). Количество в крови CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов при ХПН снижается по мере увеличения концентрации ПТГ (соответственно, R = -0,57; R = -0,51; p < 0,05) и общего кальция в сыворотке (соответственно, R = -0,49; R = -0,44; p < 0,05). Обнаружена обратная корреляция между концентрацией в крови общего кальция и количеством CD3⁺ (R = -0,64; p < 0,05) и CD45RA⁺ лимфоцитов (R = -0,59; p < 0,05).

Полагаем, что изменения иммунного статуса при ХПН, в том числе, связаны с прямыми и опосредованными эффектами ПТГ. Так, протеинкиназа C-зависимый внутриклеточный сигнальный путь, инициируемый после длительного воздействия ПТГ на клетки (24-48 ч), приводит к снижению пролиферации и активации апоптоза [19]. ПТГ стимулирует синтез в остеобластах и гепатоцитах провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, TNFα, последний известен своими проапоптогенными свойствами [22, 24]. Обнаружено, что при увеличении уровня ПТГ в крови в иммунокомпетентных клетках повышается концентрация ионизированного кальция в цитоплазме, снижается захват глюкозы, потребление кислорода, концентрация гликогена и активность гликоген-синтетазы, что угнетает функциональную активность и пролиферативный потенциал клеток [23].

При экспериментальной ХПН концентрация продуктов ПОЛ в гептановой фракции липидного экстракта лимфоцитов статистически значимо не изменилась по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Изучение содержания продуктов ПОЛ в изопропанольной фракции липидного экстракта лимфоцитов выявило значимое повышение концентрации первичных, вторичных

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ АМЛОДИПИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПОЛ В ГЕПТАНОВОЙ И ИЗОПРОПАНОЛЬНОЙ ФРАКЦИЯХ ЛИПИДНОГО ЭКСТРАКТА ЛИМФОЦИТОВ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ В КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХПН (M±m)

Показатели	Группа 1 Контроль (n = 10)	Группа 2 ХПН (n = 10)	Группа 3 ХПН + амлодипин (n = 10)
ДК (ГФ), е.и.о.	0,47±0,05	0,55±0,04	0,53±0,05
КД и СТ (ГФ), е.и.о.	0,26±0,03	0,33±0,06	0,34±0,08
ШО (ГФ), е.и.о.	0,07±0,01	0,08±0,02	0,11±0,02
ДК (ИФ), е.и.о.	0,64±0,06	1,62±0,19*	0,64±0,05*
КД и СТ (ИФ), е.и.о.	0,39±0,03	0,66±0,11*	0,43±0,03*
ШО (ИФ), е.и.о.	0,10±0,02	0,28±0,14*	0,12±0,01*
СОД в плазме, ЕД/мл	1,58±0,09	0,96±0,19*	1,51±0,05*
Каталаза в плазме, мкат/л	20,27±1,05	15,45±1,11*	14,08±0,55*

Примечание. * – p < 0,05 при сравнении с группой 1, # – с группой 2.

и конечных продуктов ПОЛ. Накопление продуктов ПОЛ в изопропанольной фракции липидного экстракта лимфоцитов периферической крови может отражать повреждение клеточных мембран и мембран органелл и, как следствие, активацию гибели лимфоцитов путем апоптоза и/или некроза. Как известно, баланс процессов свободно-радикального окисления складывается из активности прооксидантных систем генерации АФК и активности ферментов антиоксидантной защиты, прежде всего СОД и каталазы. Установлено, что при экспериментальной ХПН значительно снижается активность СОД и каталазы в плазме, что свидетельствует об угнетении антиоксидантной защиты и может выступать одной из причин увеличения содержания продуктов ПОЛ в лимфоцитах (табл. 3).

Применение амлодипина при ХПН не изменяет концентрацию в крови мочевины, креатинина, общего кальция, фосфатов и ПТГ (табл. 1). При экспериментальной ХПН под действием амлодипина отмечается восстановление показателей Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа: увеличивается интенсивность реакции ГЗТ и количество АОК в селезенке как в абсолютных значениях, так и при пересчете на 10^6 ЯСК (табл. 2). Амлодипин увеличивает представительство в кровотоке $CD3^+$ и $CD45RA^+$ лимфоцитов, их содержание достигает значений в группе ложнооперированных животных. Применение амлодипина при ХПН не оказывает статистически значимого влияния на концентрацию в крови $IL-1\beta$, $IFN\gamma$ и $IL-4$.

Полагаем, что восстановление показателей адаптивного иммунного ответа под действием амлодипина связано с уменьшением гибели лимфоцитов в кровотоке. После введения амлодипина уменьшается количество в крови лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток, увеличивается количество клеток без признаков некроза и апоптоза. Количество лимфоцитов с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток и количество клеток без признаков некроза и апоптоза не отличается от значений в группе ложнооперированных животных, а количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза становится меньше, чем в группе ложнооперированных животных.

Амлодипин при экспериментальной ХПН не оказывает значимого влияния на содержание продуктов ПОЛ в гептановой фракции липидного экстракта лимфоцитов периферической крови в пересчете на индексы окисления (табл. 3). В изопропанольной фракции липидного экстракта лимфоцитов под влиянием амлодипина

отмечается статистически значимое снижение концентрации первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. В условиях применения амлодипина при экспериментальной ХПН изменяется активность в плазме ферментов антиоксидантной защиты: увеличивается активность СОД, активность каталазы статистически значимо не изменяется. Полученные результаты позволяют констатировать ПОЛ-ограничивающий эффект амлодипина в изопропанольной фракции липидного экстракта лимфоцитов периферической крови при экспериментальной ХПН. Принимая во внимание данные о снижении концентрации продуктов ПОЛ в лимфоцитах в условиях применения амлодипина при экспериментальной ХПН, полагаем, что уменьшение количества в кровотоке лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза связано со снижением интенсивности процессов свободно-радикального окисления в лимфоцитах периферической крови.

В единичных работах представлены сведения о том, что верапамил, нифедипин, амлодипин и др. блокаторы кальциевых каналов нормализуют содержание кальция в цитоплазме иммунокомпетентных клеток, однако о последствиях этого факта в отношении реализации функциональной активности клеток не сообщается [20]. По всей видимости, иммуотропные эффекты амлодипина при ХПН, прежде всего, обусловлены восстановлением концентрации цитозольного кальция, АТФ и углеводов и как следствие коррекцией функциональной активности и пролиферации лимфоцитов. Показано, что верапамил, нифедипин, амлодипин и др. блокаторы кальциевых каналов нормализуют содержание кальция в цитоплазме и частично восстанавливают функцию фагоцитов [20].

Выводы

1. При экспериментальной ХПН наблюдаются признаки вторичного гиперпаратиреоза — повышение концентрации в сыворотке кальция и фосфатов, ПТГ.

2. Изменения иммунного статуса при ХПН включают депрессию Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа, снижение количества лимфоцитов, несущих маркеры Т- и В-клеток, увеличение концентрации в крови $IL-1\beta$, снижение концентрации $IFN\gamma$ и $IL-4$.

3. Патогенез изменений иммунного статуса при ХПН, в том числе, связан с увеличением количества лимфоцитов в периферической крови с ранними и поздними признаками апоптоза, некроза, увеличения концентрации в крови $IL-1\beta$, общего кальция, ПТГ, снижения концентрации $IFN\gamma$, увеличением количества первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в лимфоци-

тах периферической крови, угнетением активности СОД и каталазы в плазме.

4. Применение при экспериментальной ХПН блокатора кальциевых каналов амлодипина в суммарной дозе 1,75 мг/кг приводит к восстановлению Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа, увеличению количества лимфоцитов, несущих маркеры Т- и В-клеток.

5. Механизм иммуотропного действия амлодипина при экспериментальной ХПН связан со снижением количества лимфоцитов в периферической крови с ранними и поздними признаками апоптоза, признаками некроза, ПОЛ-ограничивающим эффектом в лимфоцитах периферической крови, повышением активности СОД в плазме.

Список литературы / References

1. Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Заместительная почечная терапия больных с ХПН в РФ в 1998-2011 гг. // Нефрология и диализ, 2014. № 1. С. 11-127. [Bikbov B.T., Tomilina N.A. The replaceable kidney therapy of patients with chronic renal failure in the Russian Federation in 1998-2011. *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2014, no. 1, pp 11-127. (In Russ.)]
2. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы медицинской химии, 1989. Т. 35, № 1. С. 127-131. [Volchegorsky I.A., Burbots A.G., Yarovinsky B.G. Comparison of various approaches to definition of products the oxidation of lipids in the heptan-izopropanol blood extracts. *Voprosy meditsinskoy khimii = Problems of Medical Chemistry*, 1989, Vol. 35, no. 1, pp. 127-131. (In Russ.)]
3. Коралюк М.А., Майорова И.Г. Определение активности каталазы // Лабораторное дело, 1988. № 1. С. 16-19. [Koraluk M.A., Mayorova I.G. Determination of activity of a catalase. *Laboratornoe delo = Laboratory Diagnostics*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
4. Осиков М.В. Роль орозомукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2009. Т. 148, № 7. С. 27-30. [Osikov M.V. Role of an orozomukoid in regulation of activity of systems of a plasma proteoliz at an experimental renal failure. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, Vol. 148, no. 7, pp. 27-30. (In Russ.)]
5. Осиков М.В., Григорьев Т.А., Федосов А.А. Роль эритропоэтина в реализации тромбоцитарно-клеточных взаимодействий в крови при хронической почечной недостаточности // Фундаментальные исследования, 2012. № 10-2. С. 285-289. [Osikov M.V., Grigoriev T.A., Fedosov A.A. Role of an eritropoetin in realization of trombotsitarno-cellular interactions in blood at a chronic renal failure. *Fundamental'nye issledovaniya = Basic Researches*, 2012, no. 10-2, pp. 285-289. (In Russ.)]
6. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. Патолофизиологические аспекты изменения и коррекции врожденного иммунитета при хронической почечной недостаточности // Современные проблемы науки и образования, 2013. № 5. [Электронный ресурс] [Osikov M. V., Telesheva L.F., Ageev Yu.I. Pathophysiological aspects of change and correction of congenital immunity at a chronic renal failure. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya [Elektronnyy resurs] = Modern Problems of Science and Education [An electronic resource]*, 2013, no. 5. URL: www.science-education.ru/111-9998 (date of the address: 21.01.2016). (In Russ.)]
7. Осиков М.В., Григорьев Т.А. Влияние эритропоэтина на активность систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012. Т. 153. № 1. С. 27-30. [Osikov M.V., Grigoriev T.A. Influence of an eritropoetin on activity of systems of a plasma proteoliz at an experimental renal failure. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 153, no. 1, pp. 27-30. (In Russ.)]
8. Осиков М.В., Ахматов К.В., Федосов А.А. К вопросу о механизме влияния эритропоэтина на аффективный статус у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе // Фундаментальные исследования, 2012. № 7-1. С. 140-145. [Osikov M.V., Akhmatov K.V., Fedosov A.A. To a question of the mechanism of influence of an eritropoetin on the affective status at the patients with a chronic renal failure who are on a hemodialysis. *Fundamental'nye issledovaniya = Basic Researches*, 2012, no. 7-1, pp. 140-145. (In Russ.)]
9. Осиков М.В., Черепанов Д.А., Гизингер О.А. Роль гиперпаратиреоза в формировании иммунного статуса при хронической почечной недостаточности (экспериментальное исследование) // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура, 2015. Т. 15, № 2. С. 45-51. [Osikov M.V., Cherepanov D.A., Gizinger O.A. Role of a giperparatireoz in formation of the immune status at a chronic renal failure (pilot study). *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Obrazovanie, zdravookhraneniye, fizicheskaya kul'tura = Bulletin of the Southern Ural State University. Series: Education, Health care, Physical culture*, 2015, Vol. 15, no. 2, pp. 45-51. (In Russ.)]
10. Шуркалин Б.К., Горский В.А., Фаллер А.П. Руководство по экспериментальной хирургии. М., 2010. 176 с. [Shurkalin B.K., Gorskiy V.A., Faller A.P. *Rukovodstvo po eksperimental'noy khirurgii*. M., 2010. 176 p.
11. Чевари С., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело, 1985. № 11. С. 678-681. [Chevari S., Sekey I. Role of superoxide dismutases in oxidizing processes of a cage and a method of its definition in biological materials. *Laboratornoe delo = Laboratory Diagnostics*, 1985, no. 11, pp. 678-681. (In Russ.)]

12. Betjes M.G. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2013, Vol. 5, pp. 255-265.
13. Nusair M.B., Rajpurohit J. Chronic inflammation and coronary atherosclerosis in patients with end-stage renal. *Cardiorenal. Med.*, 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 117-124.
14. Eleftheriadis T., Pissas G., Alles D. Increased plasma angiogenin level is associated and may contribute to decreased T-cell zeta-chain expression in hemodialysis patients. *Ther. Apher. Dial.*, 2013, Vol. 17, no. 1, pp. 48-54.
15. Kamanna V.S., Sanders R., Ganji S.H., Kamanna V.S., Kashyap M.L. Iron sucrose promotes endothelial injury and dysfunction and monocyte adhesion. *Am. J. Nephrol.*, 2012, Vol. 35, no. 2, pp. 114-119.
16. Meijers R.W., Meijers R.W., Litjens N.H., de Wit E.A., Langerak A.W., Van der Spek A., Baan C.C., Weimar W., Betjes M.G. Uremia causes premature ageing of the T cell compartment in end-stage renal disease patients. *Immun. Ageing.*, 2012, Vol. 9, no. 1, p. 19.
17. Wahl P. FGF23 in chronic kidney disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, Vol. 728, pp. 107-125.
18. Massry S., Smogorzewski M. Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int. Suppl.*, 2001, Vol. 78, pp. S195-196.
19. Chandra A., Lin T., Zhu J. PTH1-34 blocks radiation-induced osteoblast apoptosis by enhancing DNA repair through canonical Wnt pathway. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 1, pp. 157-167.
20. Deicher R., Kirsch B., Mullner M. Impact of parathyroidectomy on neutrophil cytosolic calcium in chronic kidney disease patients: A prospective parallel group trial. *J. Intern. Med.*, 2005, Vol. 258, pp. 67-76.
21. Dong J., Wang Q., Chen M.H. Associations between serum-intact parathyroid hormone, serum 25-hydroxyvitamin D, oral vitamin D analogs and metabolic syndrome in peritoneal dialysis patients: a multi-center cross-sectional study. *Perit. Dial. Int.*, 2014, Vol. 34, no. 4, pp. 447-455.
22. Mitnick M.A. Parathyroid hormone induces hepatic production of bioactive interleukin-6 and its soluble receptor. *American J. Physiol.: Endocrinology and Metabolism*, 2001, Vol. 280, no. 3, pp. 405-412.
23. Massry S., Smogorzewski M. Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int. Suppl.*, 2001, Vol. 78, pp. 195-196.
24. Packard R.R., Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.*, 2008, Vol. 54, pp. 24-38.
25. Pinheiro P.L., Cardoso J.C., Power D.M. Functional characterization and evolution of PTH/PTHrP receptors: insights from the chicken. *BMC Evol. Biol.*, 2012, Vol. 12, p. 110.

Авторы:

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры патофизиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета; ведущий научный сотрудник научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Гизингер О.А. — д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии вирусологии иммунологии и клинической лабораторной диагностики, старший научный сотрудник НИИ иммунологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Черепанов Д.А. — аспирант кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Leading Research Associate, Research & Educational Center for the Issues of Fundamental Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Gizinger O.A., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Senior Research Associate in Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Cherepanov D.A., Postgraduate Research Fellow, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 01.02.2016
Принята к печати 18.02.2016

Received 01.02.2016
Accepted 18.02.2016