

© Т.А.Сираева, Л.Р.Кальметьева, Ф.Х.Камилов, З.М.Еникеева, 2014
УДК 616.611-002-053.1:612.75-056

Т.А. Сираева¹, Л.Р. Кальметьева², Ф.Х. Камилов¹, З.М. Еникеева¹

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ОБМЕНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ

T.A. Siraeva, L.R. Kalmetieva, F.H. Kamilov, Z.M. Enikeeva

CLINICAL AND LABORATORY MARCERS OF METABOLISM OF THE CONNECTIVE TISSUE AMONG CHILDREN WITH DIFFERENT FORMS OF GLOMERULONEPHRITIS

¹Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа; ²Республиканская детская клиническая больница, г. Уфа

РЕФЕРАТ

Работа посвящена изучению особенностей обмена соединительной ткани и уровней провоспалительных цитокинов MCP-1 и ИЛ-8 у детей с различными вариантами гломерулонефрита (ГН), определению характера взаимодействия и взаимосвязей маркеров обмена соединительной ткани и клинико-лабораторных показателей. Обследованы 38 пациентов с нефротическим синдромом, 33 ребенка с хроническим ГН с гематурией, 12 детей с острым ГН с нефритическим синдромом (ОГН), 25 здоровых детей. Проведено изучение уровней мочевого экскреции общего оксипролина (ОБОП) и его фракций – свободного (СвОП), пептидсвязанного (ПСО), белоксвязанного (БСО) оксипролина, а также гликозаминогликанов (ГАГ), моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1) и интерлейкина-8 (ИЛ-8) в моче при различных вариантах ГН у детей. Выполнен корреляционный анализ полученных уровней мочевого экскреции исследуемых показателей. Установлено, что уровни метаболитов соединительной ткани и мочевого экскреции цитокинов MCP-1 и ИЛ-8 различаются в зависимости от характера клинического течения гломерулонефрита. В результате корреляционного анализа выявлена высокая степень сопряженности показателей мочевого экскреции оксипролина и его фракций, ГАГ, MCP-1 и ИЛ-8 с лабораторными показателями проявлений активности гломерулонефрита и его клиническим течением. Выделены критерии, позволяющие прогнозировать прогрессирование ГН и оценивать эффективность проводимой терапии.

Ключевые слова: гломерулонефрит, оксипролин, гликозаминогликаны, соединительная ткань, дети, моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1, интерлейкин-8.

ABSTRACT

The research is devoted to examining the features of metabolism of connective tissue and the levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin 8 (IL-8) among children with different forms of glomerulonephritis, determination the character of interaction and interrelations of connective tissue metabolism markers and clinical and laboratory indicators. 25 healthy children, 38 patients with nephrotic syndrome, 33 children chronic glomerulonephritis with hematuria, 12 children with acute glomerulonephritis with nephritic syndrome have been examined. Levels of renal excretion of total hydroxyproline and its fractions, and glycosaminoglycans, MCP-1 and IL-8 in the urine of different forms of glomerulonephritis have been examined. A correlation analysis of the received levels of urinary excretion of indicators has been made. It has been established that the levels of metabolites of connective tissue and urinary excretion of MCP-1 and IL-8 vary according to the nature of the clinical course of glomerulonephritis. As a result of correlation analysis high degree of complementarity indicators urinary excretion of hydroxyproline and its fractions, glycosaminoglycans, MCP-1 and IL-8 with laboratory indicators of display of the activity of glomerulonephritis and its clinical course have been revealed. The criteria have been marked out to predict the progression of the disease and assess the effectiveness of the therapy.

Key words: glomerulonephritis, hydroxyproline, glycosaminoglycans, connective tissue, children, monocyte chemoattractant protein-1, interleukin-8.

ВВЕДЕНИЕ

Гломерулонефрит – одна из наиболее тяжелых форм почечной патологии у детей, при которой в процесс вовлекаются многие органы, системы

и практически все виды обмена. При ГН происходит поражение в первую очередь эндотелия и базальной мембраны, мезангиальных клеток и мезангиального матрикса капилляров клубочков, а также канальцев и интерстициальной ткани почек [1, 2]. В воспалительный процесс вовлекается интерстициальная ткань, содержащая компоненты соединительной ткани – коллаген, гликозамино-

Сираева Т.А. 450106, г.Уфа, ул. С.Кувыкина, д. 98. Отделение ультразвуковой диагностики отдела лучевой диагностики ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница». Тел. (347) 229-08-44, E-mail: sirayeva_t@mail.ru

гликаны. По данным ряда авторов, определение концентрации оксипролина в биологических жидкостях может быть использовано для диагностики и прогноза течения болезни [3–6], в частности, для ранней диагностики нефросклероза [7].

Установлено, что любое повреждение клеток паренхимы почек приводит к продукции ими медиаторов воспаления [8–10]. Под воздействием провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 β и ФНО- α , стимулируется продукция моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1). MCP-1 является хемокином, обеспечивающим миграцию мононуклеарных клеток в очаг воспаления, и медиатором воспаления, активирующим резидентные клетки. Установлено вовлечение MCP-1 в процессы интерстициального фиброза и гломерулосклероза [11, 12]. При исследовании мочи больных с ГН выявлено повышение уровня MCP-1, коррелирующее со степенью активности тубулоинтерстициального повреждения и фиброза [1, 8, 9]. Другим мощным медиатором воспаления, участвующим в опосредовании воспалительного ответа, является ИЛ-8. Продуцируется под воздействием цитокинов (главным образом, под действием ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-3) и бактериальных эндотоксинов. ИЛ-8 выступает в качестве хемоаттрактанта для нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов [13].

В настоящее время недостаточно изученной остается система взаимосвязей между различными клинико-лабораторными показателями при прогрессировании ГН у детей, в частности взаимосвязи между активностью воспалительного процесса и метаболизмом соединительной ткани. Изучение механизмов тубулоинтерстициального фиброза имеет важное значение для определения стадии болезни, оценки эффективности проводимой терапии, что обусловило актуальность исследования обмена коллагена, экскреции гликозаминогликанов, цитокинов MCP-1 и ИЛ-8 при различных вариантах ГН у детей.

Цель исследования: оценить показатели метаболизма соединительной ткани у детей с различными вариантами ГН и выявить взаимосвязи между клиническим течением заболевания, активностью воспалительного процесса в почках.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В основную группу пациентов были включены 71 ребенок с хроническим ГН в возрасте от 6 до 17 лет. Обследованы с хроническим ГН с гематурией (ХГН с гематурией) 33 (46%) ребенка, с нефротическим синдромом – 38 детей (54%), из них у

32 отмечался гормончувствительный (ГЧНС) и у 6 – гормонрезистентный (ГРНС) варианты нефротического синдрома. Группу сравнения составили 12 детей с острым ГН с нефритическим синдромом (ОГН). В группу контроля вошли 25 практически здоровых детей. В ходе обследования применялся единый комплекс клинических, лабораторных, функциональных и инструментальных тестов.

Для оценки метаболизма соединительной ткани проводилось определение в моче общего (ОБОП), свободного (СвОП), пептидсвязанного (ПСО), белоксвязанного (БСО) оксипролина по методике Н. Stegmann (1958), модифицированной П.Н. Шареевым (2005) [14], а также гликозаминогликанов (ГАГ) с использованием карбазольной реакции [15]. Определение содержания в моче MCP-1 и ИЛ-8 осуществлялось методом твердофазного «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа моно- и поликлональных антител к MCP-1 и ИЛ-8 человека («MCP-1-ИФА-БЕСТ» и «IL-8-ИФА-БЕСТ») производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0», «Excel 8,0» с вычислением среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего значения (m) или медианы и интерквартильного размаха (25 – 75 перцентили). Достоверность различий оценивалась по U-критерию Манна–Уитни. Корреляционный анализ выполнялся по методу Спирмена с определением коэффициента ранговой корреляции (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация в моче СвОП, так же как и ОБОП, повышена у детей при всех формах гломерулонефрита при сравнении с контрольной группой ($p < 0,005$) (табл. 1). Наиболее высокие показатели (превышающие контрольные более чем в 3 раза) обнаружены у детей с ХГН с гематурией ($p = 0,0001$). При проведении сравнительного анализа уровня СвОП в моче между группами детей с ГЧНС и ГРНС различий не обнаружено. Установлено повышение концентрации в моче ПСО у детей с хроническим ГН по сравнению с детьми контрольной группы ($p < 0,005$) (см. табл. 1). Наиболее высокие значения обнаружены в группе пациентов с ГРНС и ХГН с гематурией. При ОГН содержание ПСО в моче статистически значимо не отличалось от нормативных значений.

Обнаружен высокий уровень БСО у детей с ГРНС, ХГН с гематурией и ОГН ($p < 0,005$), что, возможно, объясняется обострением активности воспалительного процесса у пациентов данных

Таблица 1

**Уровень экскреции с мочой оксипролина и гликозаминогликанов
у детей с гломерулонефритом, Ме [25%; 75%]**

Группы	СвОП, мкмоль/л	ПСО, мкмоль/л	БСО, мкмоль/л	ОБОП, мкмоль/л	ГАГ, мг/л
Контрольная группа (1-я), n=25	24,5 [22,0; 26,5]	212 [188;248]	52 [42;64]	296 [268;331]	27,8 [25,8; 30,0]
ГЧНС (2-я), n=32 p ₁₋₂	50 [48;56] 0,0001	247 [208; 294] 0,1486	47 [42; 52] 0,3222	349 [318; 397] 0,0049	30,4 [20,2; 57,8] 0,0675
ГРНС (3-я), n=6 p ₁₋₃ p ₂₋₃	50 [42;50] 0,0001 0,5252	288 [260;318] 0,0004 0,0569	70 [54; 98] 0,03220 0,0241	412 [398; 436] 0,0001 0,0067	25,8 [16,4;50,2] 0,3040 0,0462
ХГН с гематурией (4-я), n=32 p ₁₋₄ p ₂₋₄ p ₃₋₄	80 [56;96] 0,0001 0,0067 0,0013	256 [239;302] 0,01980 0,4362 0,0699	72 [56;94] 0,0144 0,0036 0,7777	412 [388;427] 0,0001 0,0036 0,7957	24,8 [18,6;44,8] 0,0902 0,0778 0,2453
ОГН (5-я), n=12 p ₁₋₅ p ₂₋₅ p ₃₋₅ p ₄₋₅	66 [66;72] 0,0002 0,0099 0,0043 0,5892	218 [182;233] 0,8493 0,1651 0,0026 0,0235	76 [60;84] 0,0301 0,0178 0,9393 0,7667	369 [308;394] 0,0087 0,9349 0,0097 0,0055	71,2 [33,0;82,0] 0,0031 0,0001 0,0034 0,0001

Таблица 2

**Уровень мочевого экскреции МСР-1 (пг/мл)
у детей с гломерулонефритом, Ме [25%; 75%]**

Контрольная группа (1-я), n=25	ГЧНС (2-я), n=32	ГРНС (3-я), n=6	ХГН с гематурией (4-я), n=33	ОГН (5-я), n=12	
				в дебюте	через 3 нед
178 [150–210]	95 [56–168] p=0,0013	671 [530–1320] p=0,0002	626 [209–707] p=0,0002	631 [554–822] p=0,0017	201 [148–257] p=0,8791

Примечание. p – достоверность различия с группой контроля.

групп. У детей с ГЧНС его показатели не отличаются у здоровых детей.

В результате исследования установлено, что мочевого экскреция ГАГ повышается у детей с ОГН – медиана составила 71,2 [33,0–82,0] мг/л. В группах детей с хроническим ГН содержание в моче ГАГ не отличалось от показателей группы контроля (p<0,005).

Для оценки активности воспалительного процесса в почечной ткани проведено определение концентрации в моче провоспалительных цитокинов МСР-1 и ИЛ-8. Мочевая экскреция МСР-1 у всех обследованных детей с заболеваниями почек статистически значимо отличалась от показателей

в контрольной группе (табл. 2). При сравнении с контрольной группой у детей с ГЧНС отмечалась более низкая экскреция МСР-1 (p<0,005). У больных с ГРНС выявлено существенное по сравнению с контрольной группой повышение медианы МСР-1: 671 [530–1320] пг/мл (p<0,005).

У детей с ХГН с гематурией установлены более высокие значения МСР-1 по сравнению с детьми с ОГН и контрольной группой (p<0,005).

В группе пациентов с ОГН определение уровня исследуемого цитокина проводилось дважды: в дебюте и с интервалом через 3–4 нед от дебюта заболевания. В дебюте установлено повышение медианы МСР-1 в моче до 631 [554–822] пг/мл по

Таблица 3

**Уровень мочевого экскреции ИЛ-8 (пг/мл) у детей
с гломерулонефритом, Ме [25%; 75%]**

Контрольная группа (1-я), n=25	ГЧНС (2-я), n=32	ГРНС (3-я), n=6	ХГН с гематурией (4-я), n=33	ОГН (5-я), n=12
3,20 [1,1–7,700]	0,65 [0,0–21,4] P=0,0043	19,80 [2,6–43,3] p=0,0034	4,10 [0,55–14,0] p=0,0044	6,85 [0,0–42,0] p=0,0035

Примечание. p – достоверность различия с группой контроля.

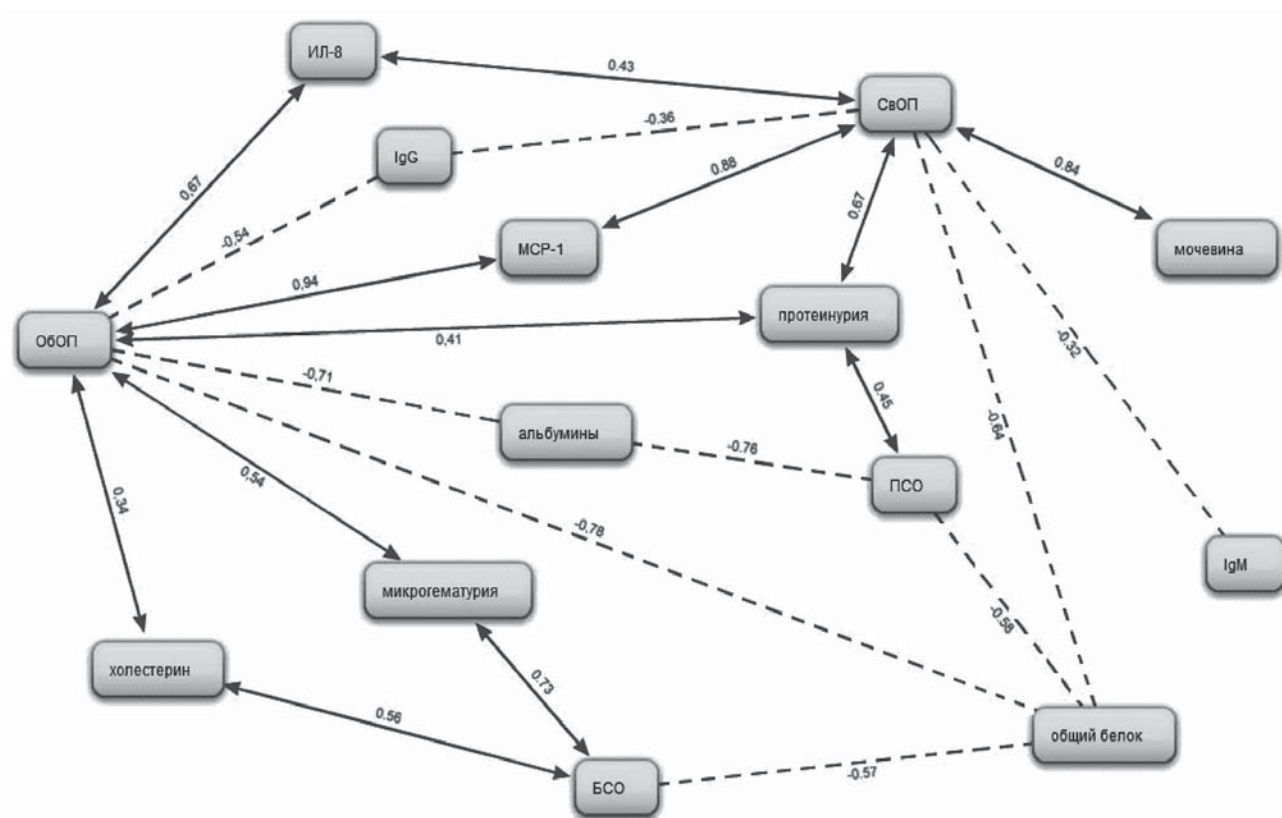


Рис. 1. Корреляционная матрица у пациентов с гормончувствительным нефротическим синдромом ($p < 0.05$). Здесь и на рис. 2–4: сплошными стрелками обозначены прямые корреляционные связи, пунктирными – обратные.

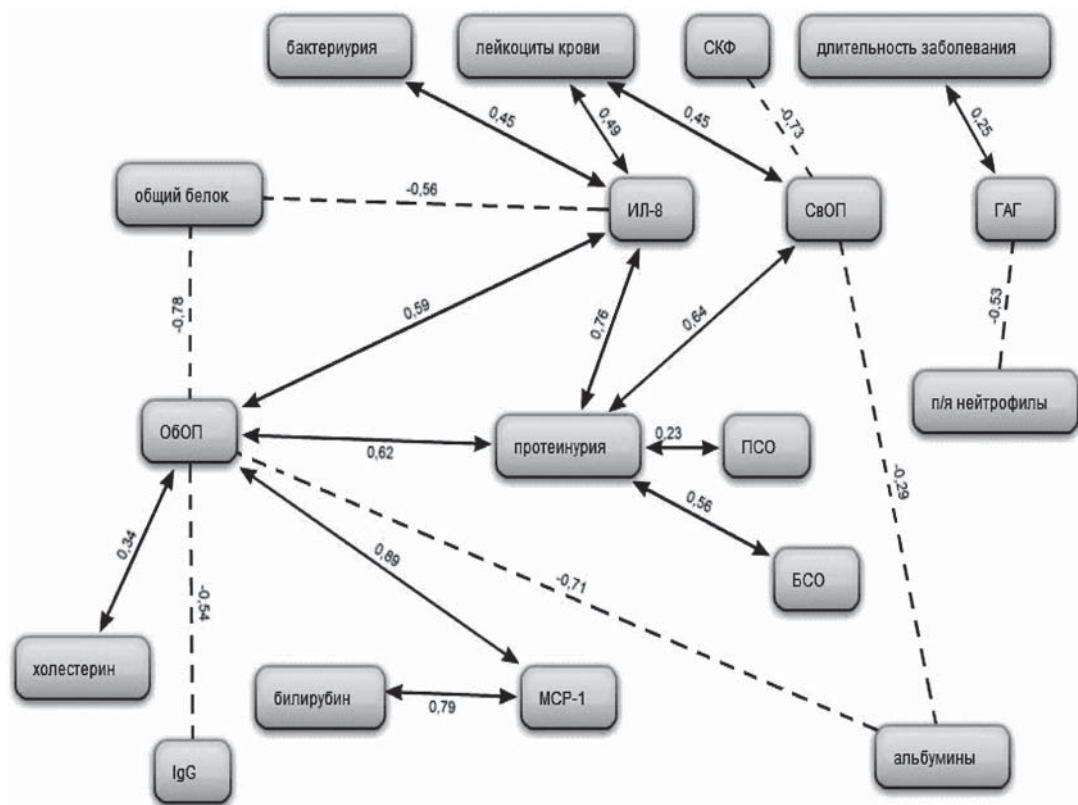


Рис. 2. Корреляционная матрица у пациентов с гормонрезистентным нефротическим синдромом ($p < 0.05$).

[illegible]

74

сравнению с контрольной группой (178 [150–210], $p < 0,005$). После начала лечения через 3–4 нед выявлено статистически значимое снижение уровня мочевой экскреции цитокина до 201 [148–257] пг/мл.

Колебания концентрации ИЛ-8 у пациентов с ГЧНС составили от 0 до 224 пг/мл, медиана 0,65 [0–21,4] пг/мл (табл. 3). При сравнении с контрольной группой у детей с ГЧНС выявлялся значительно более широкий размах значений экскреции ИЛ-8. Нами были выявлены следующие особенности: у трех детей (18% случаев) отмечались экстремально высокие показатели (224; 214,8; 104,8 пг/мл), в то время как у 11 пациентов (65%) – низкие концентрации ИЛ-8 в моче (до 1 пг/мл).

В группе пациентов с ГРНС установлены высокие значения медианы ИЛ-8 ($p < 0,005$). В группе детей с ХГН с гематурией медиана концентрации ИЛ-8 в моче составила 4,1 [0,55–14,0] пг/мл, что выше значений в контрольной группе ($p < 0,005$), но ниже, чем у детей с ГРНС.

В результате корреляционного анализа у детей с ГЧНС установлена средней и высокой силы прямая связь ОбоП с протеинурией, микрогематурией, уровнем холестерина, отрицательные связи ОбоП – общий белок, ОбоП – альбумины, ОбоП – IgG ($r_n = 0,34-0,94$, $p < 0,005$) (рис. 1). Концентрации СвОП, ПСО, БСО также имели статистически значимые коэффициенты корреляции с показателями активности процесса.

В группе детей с ГРНС выявлены взаимосвязи, характеризующие высокую активность воспалительного процесса (рис. 2).

У детей с ХГН с гематурией в результате корреляционного анализа выявлена прямая сильная положительная взаимосвязь МСР-1 с уровнем ОбоП ($r = 0,94$, $p < 0,05$). Высокую активность воспалительного процесса у пациентов данной группы характеризуют взаимосвязи с биохимическими и лабораторными данными обследованных пациентов (рис. 3).

У пациентов с ОГН корреляционный анализ также позволил выявить взаимосвязи исследуемых показателей с активностью гломерулонефрита (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования получены новые данные об уровнях мочевой экскреции показателей обмена соединительной ткани (ОбоП, СвОП, БСО, ПСО, ГАГ) и провоспалительных цитокинов (МСР-1 и ИЛ-8). При анализе полученных значений ОбоП обнаружено, что его уровень был высоким

во всех группах детей по сравнению с контрольной группой, при этом наиболее значительное повышение показателя у детей с ХГН с гематурией и ГРНС (см. табл. 1). Мы полагаем, что высокие показатели ОбоП связаны с нарушением равновесия между продукцией и распадом коллагена при длительном воспалительном процессе. Для более детального анализа процессов синтеза и распада коллагена нами изучены уровни мочевой экскреции фракций ОбоП – свободный, пептидсвязанный, белоксвязанный оксипролин.

Установленное повышение уровня СвОП (по сравнению с контрольными значениями) указывает на интенсивный распад этого наиболее распространенного белка соединительной ткани у больных при всех клинических вариантах ГН. По данным литературы известно, что СвОП образуется при полном распаде коллагенов в тканях [4, 14].

ПСО представляет собой сумму продуктов неполного распада зрелых растворимых и вновь синтезированных коллагенов, т.е. этот показатель свидетельствует о скорости биологического оборота коллагена [14]. Таким образом, выявленное в нашем исследовании повышение ПСО у детей с ГЧНС, ГРНС, ХГН с гематурией свидетельствует об ускорении фибриллогенеза при хроническом ГН.

Обнаруженное повышение уровня ГАГ при остром ГН, отсутствии его повышения при хроническом ГН свидетельствуют об остроте процесса, поскольку гликозаминогликаны первыми реагируют на процессы воспаления и деструкции, лишь в дальнейшем запуская коллагенообразование [14, 16].

В ходе исследования показано, что концентрации цитокинов МСР-1 и ИЛ-8 в моче различаются в зависимости от варианта ГН. Во всех обследованных группах, за исключением больных с ГЧНС, установлено повышение содержания МСР-1 и ИЛ-8 по сравнению с контрольными значениями. Наиболее высокие уровни исследуемых цитокинов выявлены у больных с ГРНС, характеризующихся длительным и торпидным к лечению течением болезни. Снижение уровня ИЛ-8, так же как и МСР-1, выявлено в группе ГЧНС. Уровни ИЛ-8 и МСР-1 повышаются в случае острого воспалительного процесса, которым характеризуются пациенты с ОГН, содержание цитокинов увеличивается более чем в 2 раза.

По результатам корреляционного анализа выявлена высокая степень сопряженности показателей мочевой экскреции фракций оксипролина, ГАГ, МСР-1 и ИЛ-8 с лабораторными показателями про-

явлений активности ГН и его клиническим течением. Важным результатом исследования является обнаружение взаимосвязи концентраций исследуемых показателей: ОБОП – МСР-1, ОБОП – ИЛ-8, СвОП – МСР-1, СвОП – ИЛ-8, свидетельствующее о сопряженности процессов воспаления в ткани почки и обмена коллагена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследования установлено, что уровни метаболитов соединительной ткани и мочевой экскреции цитокинов различаются в зависимости от клинического варианта ГН. Повышенная экскреция с мочой общего оксипролина и его фракций выявлена при всех вариантах ГН, увеличение содержания ГАГ обнаружено в моче у детей с ОГН с нефритическим синдромом. Повышенные концентрации в моче моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 и интерлейкина-8 обнаружены при ГРНС, ХГН с гематурией, ОГН; характерным для детей с ГЧНС является сниженный уровень цитокинов в моче.

Корреляционный анализ позволил выявить взаимосвязи мочевой экскреции уровней МСР-1, ИЛ-8, ОБОП, СвОП с клинико-лабораторными показателями при ГН у детей. Совокупный анализ результатов определения уровней провоспалительных цитокинов и показателей метаболизма соединительной ткани в моче позволяет предположить их патогенетическую роль в развитии патологического процесса в зависимости от формы ГН.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Картамышева НН, Чумакова ОВ, Кучеренко АГ. Некоторые механизмы формирования тубулоинтерстициального компонента при хронических заболеваниях почек (обзор литературы). Мед науч учеб-метод журн 2002; (6): 176-187
2. Amiko GD. Tubulointerstitium as prediktor of progression of Glomerular diseases. Nefron 1999; 83 (4): 289-295
3. Катричева-Логонова ЛВ, Лизунова ОВ, Ямщикова ИГ. Состояние обмена соединительной ткани при неспецифических кардитах у детей. Педиатрия 1982; (3): 39-42
4. Кильдиярова РР. Клиническое значение обменных нарушений соединительной ткани при гастродуоденитах и язвенной болезни у детей: Автореф дис...д-ра мед наук, М, 2001; 37
5. Малинин ОВ. Клиническое значение показателей обмена метаболизма соединительной ткани при геморрагической лихорадке с почечным синдромом: Автореф дис...канд мед наук, М., 1996; 28
6. Павлов СБ. Значение суточной оксипролинурии для ранней диагностики нефросклероза у больных хроническим пиелонефритом. Клин лаб диагностика 1998; (4): 23-24
7. Рябов ВИ, Шараев ПН, Малинин ОВ. Оксипролинурия у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. Казан мед журн 1991; (2): 126-128
8. Картамышева НН, Сергеева ТВ, Кучеренко АГ. Моноцитарный хемоаттрактивный протеин-1 (МСР-1) в патогенезе изменений тубулоинтерстициальной ткани у детей с хроническим гломерулонефритом. Нефрология и диализ 2005; (4): 443-447
9. Чеботарева НВ. Клиническое значение определения профиброгенных медиаторов в моче и ткани почки больных хроническим гломерулонефритом: Дис. ... канд. мед. наук. М, 2005
10. Cattel V. Macrophages in acute glomerular inflammation. Kidney Int 1994; 45 (4): 945-952
11. Schneider A, Panzer U, Zahner G et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. Kidney Int 1999; 56 (1): 135-44
12. Wada T, Yokoyama H, Kobayashi K. Chemokines: new target molecules in renal diseases. Clin Exp Nephrol 2000; 4 (4): 273-80
13. Gokce I, Alpay H, Biyikli N et al. Urinary levels of interleukin-6 and interleukin-8 in patients with vesicoureteral reflux and parenchymal scar. Pediatr Nephrol 2010; 25 (5): 905-912
14. Шараев ПН, Стрелков НС, Кильдиярова РР. *Соединительная ткань в детском возрасте*. Ижевск, 2005; 152
15. Шараев ПН, Пишков ВН, Соловьева НИ. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях. Лаб дело 1987; (5): 330-332
16. Чефранова НИ. Клиническое значение определения гликозаминогликанов в различных биологических жидкостях при пневмониях и бронхитах у детей: Дис. ... канд. мед. наук. М., 1989

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 31.01.2014 г.
Принята в печать: 04.04.2014 г.