

УДК 577.158: 616.15: 616.61 – 002.3 – 055.2

DOI: 10.14427/jipai.2015.4.93

Иммуно-биохимические маркеры прогнозирования рецидивирующего течения пиелонефрита

Л.В. Король, В.Е. Дриянская, Н.М. Степанова, Л.Я. Мигаль

ГУ "Институт нефрологии АМН Украины", Киев, Украина

Immuno-biochemical markers predict relapse of pyelonephritis

L.V. Korol, V.E. Driyanskaya, N.M. Stepanova, L.A. Migal

SI "Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine", Kiev, Ukraine

Аннотация

Цель исследования – оценить возможность определения трансформирующего фактора роста β (ТФР- β) индекса оксидативного стресса (ИОС) как прогностических биомаркеров рецидивирующего течения пиелонефрита (ПН). *Материалы и методы.* Содержание ТФР- β в моче и величины ИОС в сыворотке крови определяли до начала лечения у 67 женщин с ПН в возрасте от 18 до 59 лет и у 30 здоровых лиц (контроль). Рецидивирующее течение ПН (более 3 эпизодов в году) констатировано у 48 женщин (группа 1), 19 женщин имели обострение ПН до 2 раз в году (группа 2). Частота рецидивов в 1-й группе – $6,0 \pm 2,9$, во 2-й группе – $1,5 \pm 0,5$ раз на год ($p < 0,001$).

Результаты. Показано, что величины ТФР- β и ИОС у больных 1-й группы ($3,5 \pm 1,5$ пг/мл и $4,49 \pm 0,18$ усл.ед.) вероятно превышают аналогичные показатели у группы контроля $0,36 \pm 0,02$ пг/мл и $1,036 \pm 0,04$ усл.ед., $p < 0,001$) и у пациенток 2-й группы ($1,2 \pm 0,5$ пг/мл и $2,31 \pm 0,14$ усл.ед., $p < 0,001$). Также величины ТФР- β и ИОС у больных 2-й группы вероятно превышают их значения в группе контроля ($p < 0,001$). Анализ ROC кривых свидетельствует, что при регистрации содержания ТФР- $\beta > 2$ пкг/мл, а величин ИОС $> 2,5$ усл.ед. вероятность развития рецидивирующего течения ПН прогнозируют в 97,6 % случаев.

Итак, определение ТФР- β и ИОС возможно использовать в качестве прогностических биомаркеров рецидивирующего течения ПН, что позволит своевременно назначить адекватную терапию, повысить её эффективность и снизить частоту рецидивов.

Ключевые слова

Трансформирующий фактор роста β , индекс оксидативного стресса, прогностические биомаркеры, рецидивирующий пиелонефрит.

Summary

The purpose of research - to evaluate the possibility of determining the transforming growth factor- β (TGF- β) and the oxidative stress index (OSI) as a prognostic biomarker recurrent course of pyelonephritis (PN).

Materials and methods. The content of TGF- β in the urine and OSI values in serum of blood were determined before treatment in 67 women with PN aged 18 to 59 years (mean $36 \pm 7,7$ years) and 30 healthy persons (control). Relapse within PN (more than 3 episodes in year) is ascertained in 48 women (group 1), 19 women had worsening of PN up to 2 times in year (group 2). The recurrence rate at the 1-st group - $6,0 \pm 2,9$, the 2nd group - $1,5 \pm 0,5$ times in year ($p < 0,001$).

Results. It is shown that the value of TGF- β and the OSI at the first group patients ($3,5 \pm 1,5$ pg / ml and $4,49 \pm 0,18$ standard units) is probably higher than those in patients of the control group ($0,36 \pm 0,02$ pg / ml and $1,036 \pm 0,04$ standard units, $p < 0,001$) and at the 2-nd group patients ($1,2 \pm 0,5$ pg / ml and $2,31 \pm 0,14$ standard units, $p < 0,001$). Also, the value of TGF- β and the OSI at the 2-nd group patients probably exceed the values at the control group ($p < 0,001$). Analysis of ROC curves indicates that the registration content of TGF- $\beta > 2$ pg / ml, and the OSI values > 2.5 standard units the probability of developing recurrent PN forecast 97.6% of cases.

Conclusion. Thus, the determination of TGF- β and the OSI may be used as prognostic biomarkers recurrent course PN, allowing timely adequate therapy, increase its promises more effective and reduce the frequency of relapses.

Keywords

Transforming growth factor- β , oxidative stress index, prognostic biomarkers, recurrent pyelonephritis.

Рецидивирование инфекций мочевой системы (ИМС) в целом и пиелонефрита (ПН), в частности, является одной из самых сложных проблем современной медицины, с которой сталкиваются врачи-нефрологи, урологи и терапевты в своей повседневной практике. Актуальность проблемы рецидивирующего ПН обусловлена его значительной распространенностью среди женщин сексуально активного возраста. Около 70% женщин пременопаузального возраста по крайней мере хоть раз в жизни переносят ИМС, а у 25-30% из них развивается рецидивирующее течение заболевания [1], когда отмечают более двух рецидивов ПН в течение полугода или более трех в течение года [1, 2]. Рецидивирующее течение заболевания приводит к постоянному приему антибактериальной терапии и появлению полирезистентных штаммов бактерий, неэффективности назначенного лечения и значительным экономическим затратам. Все это обосновывает необходимость определения предикторов формирования рецидивирующего течения ПН, особенно в условиях отсутствия усложняющих факторов. Бесспорным является тот факт, что формирование рецидивов происходит при наличии как минимум нескольких составляющих: уропатогенных микроорганизмов, недостаточности иммунного ответа и развитии оксидативного стресса (ОС). Так, в иммуногенезе ПН важную роль играют цитокины, которые отвечают за все последовательные этапы развития адекватного ответа на вмешательство патогена, обеспечение его локализации и уничтожения, восстановления поврежденной структуры тканей. Цитокины регулируют развитие местных защитных реакций в тканях с участием различных типов клеток крови, эндотелия, соединительной ткани и эпителия. В этой связи внимание привлекает трансформирующий фактор роста β (ТФР- β), который оказывает супрессорное и противовоспалительное действие, защищая организм от избыточной продукции макрофагами и другими воспалительными клетками цитотоксических веществ. ТФР- β также стимулирует синтез коллагена и фибронектина фибробластами и является одним из самых мощных из известных на сегодня просклеротических цитокинов [3, 4].

Согласно современным представлениям, в патогенезе многих заболеваний, в частности ПН, важная роль принадлежит ОС, который развивается в результате дисбаланса между оксидантным и антиоксидантным (О/А) системами и сопровождается накоплением в крови и тканях высоких концентраций продуктов перекисидации [5-7]. В

последнее время активно ведется поиск новых маркеров в оценке О/А дисбаланса как составляющей метаболического ответа организма на патологический процесс и выразительности ОС. В предыдущих работах нами было предложено применение индекса ОС (ИОС) - интегрального показателя, характеризующего состояние О/А баланса в сыворотке крови, который объективно отражает взаимосвязь между процессами перекисидации и антиоксидантной реакцией индивидуально у каждого пациента [8]. Кроме того, было продемонстрировано, что у больных с рецидивирующим течением ПН по отношению к больным, у которых обострение ПН было до 2 раз в году, существенно увеличивается интенсивность ОС [2]. Однако, несмотря на выраженную необходимость выявления предикторов хронизации воспалительного процесса в почках (как предикторов рецидивирования ПН), до сих пор не определены наиболее значимые биомаркеры, которые информативно отражают вероятность прогнозирования развития его рецидивов. Ранний и точный прогноз возможного рецидивирующего течения ПН позволит своевременно назначить иммуотропную и профилактическую терапию, что будет способствовать повышению эффективности лечения и снижению частоты рецидивов [1].

Цель исследования - оценить возможность использования ТФР- β и ИОС как прогностических биомаркеров рецидивирующего течения ПН.

Материалы и методы

Содержание ТФР- β в крови и моче и интенсивность ОС по величинам ИОС в сыворотке крови определяли до начала лечения у 67 женщин, больных ПН в возрасте от 18 до 59 лет (в среднем $36 \pm 7,7$ лет) и 30 практически здоровых лиц того же возраста и пола с нормальными анализами мочи и без заболеваний почек и мочевыводящих путей в анамнезе (референтная группа). Рецидивирующее течение болезни (более 3 эпизодов за год) констатировано у 48 женщин (группа 1, основная), 19 женщин имели обострения ПН до 2 раз в год (группа 2, группа сравнения). Частота рецидивов в 1-й группе составила $6,0 \pm 2,9$ в году, во 2-й группе - $1,5 \pm 0,5$ в году ($p < 0,001$). Длительность заболевания составляла от 1 до 29 лет (в среднем $7,2 \pm 5,7$ года). Все пациентки дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения пациентов в исследование были: наличие клинических признаков заболевания (дизурия, частое мочеиспускание,

повышение температуры тела, ощущение боли и тяжести в крестцово-поясничной области и другие), лейкоцитурия и бактериурия. Критериями исключения были: отказ больного от участия в исследовании, беременность и период лактации, признаки обструкции мочевой системы, снижение скорости клубочковой фильтрации <60 мл / мин.

Комплекс обследования, кроме общепринятых методик, включал определение содержания ТФР- β иммуноферментным методом по инструкции производителя, а также компонентов О/А системы сыворотки крови: определение содержания малонового диальдегида (МДА), содержания церулоплазмينا (ЦП), содержания трансферрина (Тр) и содержания сульфгидрильных (SH) групп [8]. Расчет ИОС в сыворотке крови женщин, больных ПН, проводили по следующей формуле: $ИОС = \frac{МДАб}{МДАк} \cdot \left[\frac{ЦПб}{ЦПк} + \frac{Трб}{Трк} + \frac{SHб}{SHк} \right]$, где ИОС - индекс оксидативного стресса; МДАб- содержание МДА у больного; МДАк- содержание МДА контроля (среднее значение) ЦПб- содержание ЦП у больного; ЦПк - содержание ЦП контроля (среднее значение) Трб - содержание Тр у больного; Трк - содержание Тр контроля (среднее значение) SHб -с одержание SH-групп у больного; SHк - содержание SH-групп контроля (среднее значение) 3 - количество слагаемых [8]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ "Statistica 10 for Windows" и "MedCalc". Рассчитывали среднюю арифметическую величину и ее погрешность ($M \pm m$) [9]. Статистическую достоверность результатов исследований оценивали по t-критерию Стьюдента с помощью Microsoft Exel 8.0.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования демонстрируют существенное повышение содержания ТФР- β в крови при хроническом ПН до $123,5 \pm 6,01$ пкг / мл по сравнению с условно-здоровыми донорами $56,6 \pm 1,5$ пкг / мл ($p < 0,001$). Наряду с этим выявлены и высокие его уровни в моче ($2,35 \pm 1$ пкг /

мл по сравнению с $0,36 \pm 0,02$ пкг / мл ($p < 0,001$)). Анализируя результаты в зависимости от количества рецидивов ПН установлено, что рецидивирующее течение заболевания характеризуется более высокими уровнями ТФР- β в крови и моче. Так, в крови уровень ТФР- β в группе 1 превышает величины в группе 2 почти в 1,5 раза, а в моче - в 2,7 раза. (Табл.1).

Считается, что повышение уровня противовоспалительного и просклеротического лимфокина ТФР- β в крови ассоциируется с высокой адгезивной способностью клеток крови и эндотелия, а рост его продукции у больных с хроническим ПН является скорее негативным фактором, так как этот цитокин может как подавлять иммунный ответ, так и способствовать пролиферации соединительной ткани и фиброзу почек [7, 10, 11]. Также известно, что продуцентами ТФР- β есть регуляторные клетки и макрофаги. В процессе активации макрофаг проходит ряд стадий, которые отличаются влиянием на клетки-мишени. Цитотоксическую фазу ответа меняет более длительная фаза регенеративных процессов в очаге воспаления [72]. Считают, что именно этот фактор роста может переключать активность макрофага с деструктивной на продуктивную. Также показано, что синтез макрофагами ТФР- β повышается одновременно после их активации. По мере нарастания продукции ТФР- β снижается синтез ФНО- α , а антитела к ТФР- β усиливают цитотоксические эффекты макрофагов. Показано, что именно ФНО- α стимулирует экспрессию ТФР- β , который подавляет затем его секрецию. [4, 12].

При сравнении величин содержания ТФР- β в моче между группами 1 и 2 констатировано, что его уровень в группе 1 был достоверно выше показателей в группе 2. Такие высокие уровни ТФР- β в моче, коррелируют с частотой рецидивов, что подтверждает возможность их дополнительной локальной секреции эпителиоцитами при взаимодействии с бактериями, а при рецидивирующем течении еще и реакцией иммунной системы на недостаточную эрадикацию

Таблица 1 Уровень ТФР- β в крови и моче пациентов при хроническом пиелонефрите ($M \pm m$) (пкг / мл)

Биологический материал	Условно-здоровые (контроль) (n=30)	Хронический пиелонефрит		$P_{к-1}$	P_{1-2}
		Группа 1 (n=48)	Группа 2 (n=19)		
Сыворотка крови	$56,6 \pm 1,5$	$103,2 \pm 12,2$	$67,8 \pm 0,98$	<0,001	<0,001
Моча	$0,36 \pm 0,02$	$3,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,03$	<0,001	<0,001

возбудителей вследствие нарушений распознавания антигенов. Это указывает на их участие в иммунопатогенезе рецидивирующего ПН.

Известно, что при воспалении адгезию (фиксацию) моноцитов и нейтрофилов на поверхности эндотелия активируют протеины клеточных взаимодействий, происходит активная инфильтрация тканей циркулирующими в крови моноцитами и нейтрофилами, а активированные нейтрофилы и тканевые макрофаги усиливают образование супероксидрадикалов и активируют перекисное окисление белков и липидов [4,12].

Сравнительный анализ величин ИОС в зависимости от частоты рецидивирования ПН определил достоверное повышение интенсивности ОС в крови пациенток с рецидивирующим течением ПН ($4,49 \pm 0,18$ у.е. у пациенток с 1-й группы против $2,31 \pm 0,14$ усл. ед. у пациенток со 2-й группы; $p_{1-2} < 0,001$). Среднее содержание величин ИОС в крови в группе контроля (группа 3) составил $1,036 \pm 0,04$ у.е. ($p_{1-3}, 2-3 < 0,001$). Обращает на себя внимание, что рост величины ИОС у больных ПН осуществляется за счет повышения интенсивности процессов окисления и накопления МДА в сыворотке крови (почти в 2 раза у пациенток 2-й группы и почти в 4 раза у пациенток 1-й группы), а также за счет существенных изменений показателей АОЗ (в частности снижение содержания Тр и SH-групп). Особенно это характерно для пациенток 1-й группы, что свидетельствует о существенной активации процессов окисления и о напряженности механизмов АОЗ, что согласуется с данными литературы и результатам наших собственных исследований [2, 8, 10, 11]. Итак, проведенный

ретроспективный анализ содержания ТФР-β и величин ИОС больных ПН в зависимости от особенностей течения болезни (рецидивирующего, спорадического) наглядно и статистически достоверно подтвердил целесообразность выбранного нами подхода к информативному и объективному прогнозированию дальнейшего течения болезни.

Была установлена закономерность повышения содержания ТФР-β в моче и величин ИОС в сыворотке крови в зависимости от частоты рецидивов, что обеспечило возможность определения их диагностического значения с помощью анализа ROC кривых. С помощью этого анализа были оценены операционные характеристики применения ТФР-β и ИОС в качестве предикторов рецидивирующего течения ПН. Для определения оптимальных критериев - порогового значения ТФР-β и ИОС, которые позволят спрогнозировать развитие рецидивов ПН, рассчитывали индекс Юдена (табл.2).

Как видно из приведенных в таблице 2 данных, в случае определения содержания ТФР-β в моче > 2 пкг / мл, а величин ИОС в сыворотке крови $> 2,5$ усл. ед. можно с вероятностью 97,6-100% прогнозировать развитие рецидивирующего течения ПН

Таким образом, одновременное определение содержания ТФР-β в моче, который является одним из самых мощных просклеротических цитокинов, и ИОС - интегрального показателя, объективно отражающего баланс между О/А процессами, можно использовать как высокоинформативный прогностический маркер развития рецидивов ПН.

Таблица 2 Прогностическая эффективность определения содержания ТФР-β в моче и ИОС в сыворотке крови больных ПН с рецидивирующим течением

Площадь под ROC кривой (Area Under Curve – AUC)		
	ТФР-β	ИОС
AUC	$1,0 \pm 0$	$0,93 \pm 0,02$
95% ДИ	0,89-1,0	0,87 - 0,97
Z-тест	11,7	15,3
P	$< 0,0001$	$< 0,001$
Оптимальный критерий (пороговое значение показателей)		
Индекс Юдена	1,0	0,77
Асоциированный критерий	> 2 пкг/мл	> 3 усл.ед.
Пороговое значение	> 2 пкг/мл	$> 2,5$ усл.ед..
Чувствительность	100%	97,6%
Специфичность	100%	75,0%

Заключение

Таким образом, развитие ПН и его рецидивирующее течение сопровождается повышенным уровнем провоспалительных цитокинов ТФР- β , что коррелирует с частотой рецидивов, указывая на их участие в иммунопатогенезе рецидивирующего ПН. Показано, что ПН принадлежит к воспалительным процессам с повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов и интенсификацией процессов оксидации. Использование определения еще до начала лечения содержания ТФР- β в моче и величин ИОС в сыворотке крови как про-

гностических биомаркеров рецидивирующего течения ПН позволяет спрогнозировать вероятность его развития в 97,6% случаев и заблаговременно предупредить неблагоприятное течение болезни (ее хронизацию) за счет своевременной коррекции лечебной тактики. Информативность определения ТФР- β в моче и величин ИОС в сыворотке крови делает использование этих предикторов вполне оправданным и целесообразным, что позволяет повысить точность диагностики и прогнозирования рецидивов ПН, а также эффективность лечения пациентов.

Литература

1. Kolesnyk M. Pathogenesis of pyelonephritis: what we know and what not Ukr. J. Nephrology and Dialysis. 2011; N 3 (31): 34-46.
2. Stepanova N. Oxidative process in patients with recurrent pyelonephritis and relationship with renal scarring. Ukr. J. Nephrology and Dialysis. 2012; N 3 (35): 12-17.
3. Зайкова Н. Использование профиброгенных факторов для ранней диагностики тубуло-интерстициального фиброза. Нефрология и диализ 2011; Т. 13, № 3: 340-341.
4. Konigshoff M. TGF-beta signaling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimen. Swiss Med Wkly. 2009; Vol. 139: 554-563.
5. Kao M. P. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. J. Hum. Hypertens. 2010; Vol. 24, N 1: 1-8.
6. Puchades Montesa M. J. Study of oxidative stress in advanced kidney disease. Nefrología. 2009; Vol. 29, N 5: 464-473.
7. Massy Z. A. The role of oxidative stress in chronic kidney disease [Text]. Semin. Dial. 2009; Vol. 22 (4): 405-408.
8. Patent № 102192 UA, CIP G01N 33/48 (2006.01). Method of integral evaluate of oxidant-antioxidant balance in blood serum / Korol L. V., Myhal L. A.; SI "Institute of Nephrology NAMS of Ukraine"; № a 201205647; 08.05.2012; Publ. 10. 06. 2013, Bul. № 11, 4 p.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиасфера, 2003, 312 с.
10. Fasset R.G. Biomarkers in chronic kidney disease. Kidney Int. 2011; Vol. 80 (8): 806-821.
11. Puchades Montesa M. J. Study of oxidative stress in advanced kidney disease [Текст]. Nefrologia. 2009; Vol. 29 (5): 464-473.
12. Kolesnyk M. Effects of immunocorrection on the state of cytokines and SLPI in patients with pyelonephritis. Ukr. J. Nephrology and Dialysis. 2014; N 1 (41): 19-29.

Поступила 08.12.2015 г.