

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.61-008.6-053.2-092:612.017.1]-078.33

Т. С. Вознесенская, Т. В. Бершова, Т. В. Сергеева, Е. К. Кутафина

ЗНАЧЕНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-18 ПРИ НЕФРОТИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ У ДЕТЕЙ

Научный центр здоровья детей РАМН, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 2/62

*Интерлейкин (IL)-18, член семейства IL-1, новый иммунорегуляторный цитокин, может играть важную роль в развитии гломерулопатий.**Цель исследования – изучение участия IL-18 в патогенезе нефротического синдрома у детей.**Уровни IL-18 в сыворотке крови и моче были определены методом энзимсвязанного иммуносорбентного анализа у пациентов со стероидчувствительным и со стероидрезистентным нефротическим синдромом в различных клинических стадиях болезни. Референтная группа включала 14 практически здоровых детей.**Установлено, что при стероидчувствительном нефротическом синдроме уровень IL-18 в моче в активной стадии был выше при сравнении со стадией ремиссии и референтной группой. Уровни IL-18 в моче коррелировали со степенью протеинурии у стероидчувствительных больных и при стероидрезистентном нефротическом синдроме с минимальными изменениями. При стероидрезистентном нефротическом синдроме повышенные значения сывороточного IL-18 наблюдались в основном при пролиферативных гломерулопатиях.**Таким образом, IL-18 может иметь патофизиологическое значение как при стероидчувствительном, так и при стероидрезистентном нефротическом синдроме.***Ключевые слова:** интерлейкин-18, нефротический синдром, дети

T. S. Voznesenskaya, T. V. Bershova, T. V. Sergeyeva, E. K. Kutafina

VALUE OF INTERLEUKIN-18 IN CHILDHOOD NEPHROTIC SYNDROME

Children's Health Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, 2/62 Lomonosovsky Prosp., Moscow 119991

*Interleukin (IL) 18, a member of the IL-1 family and a novel immunoregulatory cytokine, may play an important role in the development of glomeropathies.**The purpose of the investigation was to study the involvement of IL-18 in the pathogenesis of nephrotic syndrome in children. The serum and urinary levels of IL-18 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with steroid-resistant nephrotic syndrome in different clinical stages of the disease. The reference group included 14 apparently healthy children.**In steroid-responsive nephrotic syndrome, the urinary level of IL-18 was ascertained to be higher in its active stage than in remission and in the reference group. The urinary IL-18 levels were correlated with the degree of proteinuria in steroid-responsive patients and in steroid-resistant nephrotic syndrome with minimal changes. In steroid-resistant nephrotic syndrome, elevated serum IL-18 levels were observed mainly in proliferative glomerulopathies.**Thus, IL-18 may be of pathophysiological value in both steroid-responsive and steroid-resistant nephrotic syndrome.***Key words:** IL-18, nephrotic syndrome, children

Виммунопатогенезе гломерулярных заболеваний, и нефротического синдрома в частности, определенное значение имеет дисбаланс Т-лимфоцитов. Предполагается, что при идиопатическом нефротическом синдроме иммунный ответ развивается преимущественно по Th2-пути с участием различных цитокинов, перечень которых все расширяется.

Интерлейкин (IL)-18 является провоспалительным цитокином, опосредующим воспаление и ишемическое повреждение многих органов. Он представляется новым членом семейства IL-1, известного как важный регулятор иммунного ответа. Подобно IL-1 β , IL-18 синтезируется в виде биологически неактивного предшественника, который для превращения в активную, зрелую молекулу требует расщепления внутриклеточным ферментом каспазой-1 [1]. Наиболее доказано участие IL-18 в иммунном ответе Т-хелперных клеток 1-го типа (Th1), которое осуществляется в первую очередь благодаря его способности индуцировать продукцию интерферона- γ (IFN- γ) Т-клетками и естественными

киллерами [2]. IL-18 может способствовать развитию хронического воспаления не только через индукцию IFN- γ , но и стимулируя экспрессию и продукцию адгезивных молекул и хемокинов. Так, например, было показано, что IL-18 индуцирует экспрессию молекул межклеточной адгезии 1-го типа (ICAM-1) в моноцитах человека и этот эффект не зависит от IFN- γ [4]. Кроме того, IL-18 усиливает эффекты других провоспалительных цитокинов, включая IL-1. Более того, IL-18 не является эксклюзивным стимулятором только Th1-иммунного ответа, он может участвовать и в Th2-типе иммунитета, например при отсутствии IL-12 [9, 10].

Исследования, касающиеся участия IL-18 в Th12-иммунном ответе, немногочисленны, недостаточно изучено клиническое значение IL-18 у детей с нефротическим синдромом, что определило цель нашей работы.

Материалы и методы

В исследование были включены дети в возрасте от 2 до 17 лет с нефротическим синдромом. Нефротический синдром диагностировали при наличии гипоальбуминемии не более 25 г/л и протеинурии более 2,5 г/сут. Были выделены группы детей со сте-

Для корреспонденции: Вознесенская Татьяна Сергеевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. нефрологического отд-ния НИИ педиатрии НЦЗД

роидчувствительным и стероидрезистентным нефротическим синдромом. Исследование уровней IL-18 проведено у 40 больных со стероидчувствительным и у 56 больных со стероидрезистентным нефротическим синдромом. В активной стадии болезни находились 18 детей со стероидрезистентным и 8 – со стероидчувствительным нефротическим синдромом, в стадии ремиссии были 38 (в неполной 16, в полной 22) пациентов со стероидрезистентным и 32 – со стероидчувствительным нефротическим синдромом. Биопсия почки была выполнена у 73 больных, установлены следующие морфологические диагнозы: нефротический синдром с минимальными изменениями (НСМИ) у 37, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) у 18, мезангиопролиферативный гломерулонефрит (МезПГН) у 12, мезангиокапиллярный гломерулонефрит (МКГН) у 5. Все дети получали иммуносупрессивную терапию: преднизолон, сандимун-неорал, селлсепт или их сочетание.

По результатам патогенетической терапии выделялись полная ремиссия, частичная ремиссия и отсутствие эффекта. Полная ремиссия характеризовалась нормализацией анализов мочи и крови. Частичная ремиссия выражалась в уменьшении протеинурии до небольшой и нормализации сывороточного альбумина. При резистентности к терапии перечисленные симптомы сохранялись или прогрессировали.

Референтная группа включала 14 условно здоровых детей от 3 до 16 лет.

Уровень IL-18 в крови и моче определялся методом твердофазного энзимсвязанного иммуносорбентного анализа (ELISA). Забор крови осуществлялся утром, до приема пищи. Определение IL-18 в моче проводилось во 2-й утренней порции. Для устранения влияния разведения (концентрирования) оценивалось соотношение уровней IL-18 и креатинина в той же порции мочи.

Статистическая обработка данных проводилась методами описательной статистики, сравнения выборок (*U*-критерий Манна–Уитни, метод Краскела–Уоллиса) и корреляционного анализа (коэффициент корреляции Спирмена). Уровень статистической значимости *p* принят равным 0,05. Анализ данных проводился с помощью пакета программ Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

При анализе уровней IL-18 в сыворотке крови у детей референтной группы были выявлены различия его содержания в зависимости от возраста. У детей до 6 лет медиана составила 319,8 пг/мл (интерквартильный размах от 64,8 до 339,8 пг/мл), тогда как в возрасте старше 6 лет медиана равнялась 60,4 пг/мл (интерквартильный размах от 29 до 116,2 пг/мл) (*p* = 0,02).

Исследование содержания IL-18 в моче в пересчете на креатинин в референтной группе выявило, что у здоровых детей медиана и интерквартильный размах составили 15,5 пг на 1 мг креатинина и от 6,1 до 23,1 пг на 1 мг креатинина вне зависимости от возраста.

У стероидчувствительных пациентов уровень сывороточного IL-18 не превышал нормальных значений как в активной стадии, так и в стадии ремиссии. В активной стадии кровь была исследована у 3

больных, медиана IL-18 равнялась 56 пг/мл (интерквартильный размах от 53,6 до 120,8 пг/мл). В стадии ремиссии сывороточный IL-18 определен у 5 пациентов, 1 из них был в возрасте до 6 лет, уровень IL-18 в сыворотке у него составлял 78,2 пг/мл, у оставшихся 4 медиана равнялась 47 пг/мл (интерквартильный размах от 28 до 86,1 пг/мл).

Среди стероидрезистентных пациентов в возрасте 6 лет и младше на момент обследования было 10 человек, 18 детей были старше 6 лет.

У детей до 6-летнего возраста медиана IL-18 в сыворотке крови составила 52,6 пг/мл (интерквартильный размах от 33,6 до 89,4 пг/мл), только у 1 ребенка референтные значения были превышены. Нефробиопсия выявила у них следующие морфологические изменения: НСМИ у 3, МезПГН у 1, МКГН у 1; 2 детям, в том числе ребенку с повышенным уровнем IL-18, биопсия почки не проводилась. Шестеро из них были в активной стадии заболевания, в том числе пациент с повышенным уровнем IL-18, 3 – в неполной ремиссии и 1 – в полной ремиссии.

У детей старше 6 лет медиана IL-18 в сыворотке крови равнялась 300,8 пг/мл (интерквартильный размах от 26,8 до 469,6 пг/мл), показатель был выше референтных значений у 12 человек. У 8 из последних при морфологическом исследовании обнаружены пролиферативные формы гломерулопатий (МКГН у 4, МезПГН у 4), у 2 НСМИ, у 1 ФСГС, одному ребенку нефробиопсия не проводилась. В активной стадии было обследовано 4 пациента, в стадии неполной ремиссии – 4 и в полной ремиссии – 4. Воспалительные изменения в крови отсутствовали, уровень С-реактивного белка не превышал нормальных значений у всех пациентов.

У 6 детей старше 6 лет с нормальным уровнем IL-18 в крови при нефробиопсии были выявлены следующие морфологические диагнозы: ФСГС у 4, НСМИ у 1, мембранозная нефропатия – у 1. 3 из них находились в активной стадии заболевания, оставшиеся 3 – в стадии неполной ремиссии.

При выделении детей с пролиферативными гломерулопатиями в группе детей старше 6 лет обнаружены статистически значимые различия в уровне сывороточного IL-18 по сравнению с референтной подгруппой старше 6 лет (*Me* = 473 пг/мл, интерквартильный размах от 420,4 до 515,4 пг/мл и *Me* = 60,4 пг/мл, интерквартильный размах от 29 до 116,2 пг/мл соответственно) (*U*-критерий; *p* = 0,001).

Пациенты со стероидрезистентным нефротическим синдромом, у которых уровень сывороточного IL-18 был повышен (*n* = 13), заболели в более старшем по сравнению с детьми с референтными его значениями (*n* = 15) возрасте (*Me* = 98 мес, интерквартильный размах от 48 до 120 мес и *Me* = 36, интерквартильный размах от 22 до 72 мес соответственно) (*U*-критерий, *p* = 0,03).

Уровень IL-18 в моче у стероидчувствительных пациентов в активной стадии (*Me* = 274,5 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 104 до 336,6 пг на 1 мг креатинина) был значимо выше, чем в стадии ремиссии (*Me* = 14,2 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 3,7 до 28,5 пг на

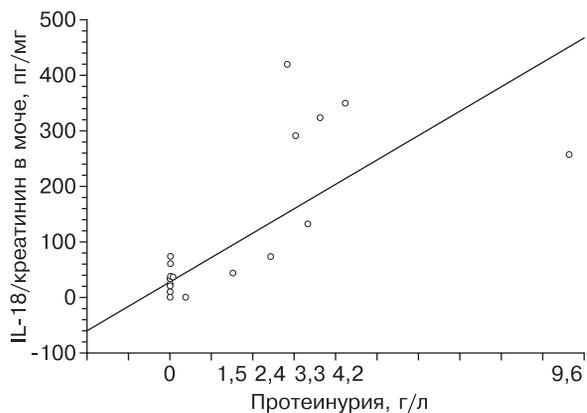


Рис. 1. Корреляция уровня IL-18 в моче и протеинурии при стероидчувствительном нефротическом синдроме.

$$\text{IL-18/креатинин} = 27,6192 + 44,0948 \cdot x.$$

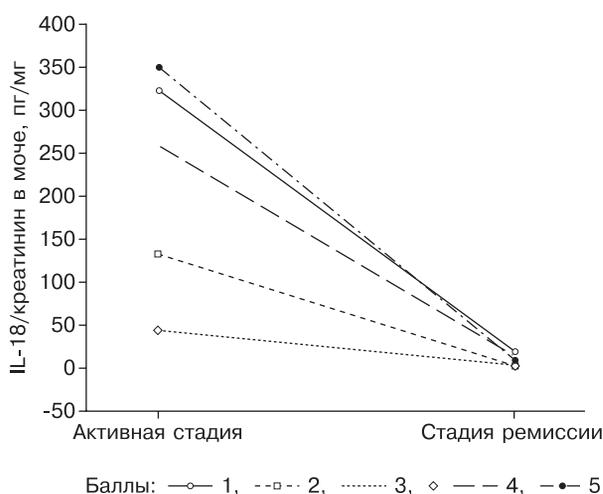


Рис. 2. Динамика уровня IL-18 в моче при стероидчувствительном нефротическом синдроме.

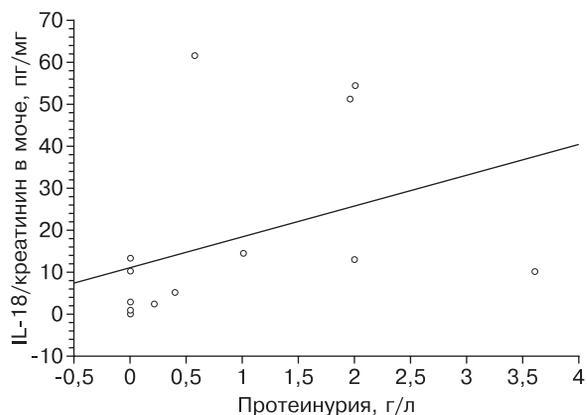


Рис. 3. Корреляция уровня IL-18 в моче и протеинурии при стероидрезистентном НСМИ.

$$\text{IL-18/креатинин} = 11,1232 + 7,3366 \cdot x.$$

1 мг креатинина) и у детей референтной группы (Me = 15,5 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 6,1 до 23,1 пг на 1 мг креатинина) (U -критерий; $p < 0,0001$ и $p = 0,0001$ соответственно).

При стероидчувствительном нефротическом синдроме наблюдалась положительная корреляционная

связь между IL-18 в моче и протеинурией. Коэффициент корреляции Спирмена ($r_s = 0,63$; $p < 0,0001$) (рис. 1).

У 5 больных со стероидчувствительным нефротическим синдромом, которые были обследованы как в активной стадии, так и в стадии ремиссии, отмечено быстрое снижение показателя IL-18 в моче после купирования рецидива (рис. 2).

Необходимо отметить, что при стероидчувствительном нефротическом синдроме у всех кроме 1 пациента при биопсии был обнаружен НСМИ, у оставшегося выявили МезПГН.

У стероидрезистентных больных содержание IL-18 в моче в активной стадии (Me = 38,6 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 16,7 до 89,7 пг на 1 мг креатинина), в стадиях полной (Me = 41,4 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 5,4 до 71,9 пг на 1 мг креатинина) и неполной ремиссии (Me = 35,0 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 9,2 до 125,8 пг на 1 мг креатинина) статистически не различалось (критерий Краскела–Уоллиса; $p = 1,0$). Повышенные значения IL-18 в моче были выявлены практически у половины детей как в активной стадии (у 10 из 18), так и в стадии полной (у 12 из 22) и неполной (у 8 из 16) ремиссии. Однако в активной стадии и стадии неполной ремиссии уровень IL-18 в моче был выше, чем в референтной группе ($p = 0,01$ и $p = 0,058$ соответственно).

В стадии полной ремиссии как у стероидчувствительных, так и у стероидрезистентных пациентов экскреция IL-18 с мочой не превышала референтных значений.

После выделения в стероидрезистентной группе (в активной стадии и стадии неполной ремиссии) пациентов с установленным морфологическим диагнозом: НСМИ ($n = 8$), ФСГС ($n = 9$), МКГН ($n = 4$) и МезПГН ($n = 3$) оказалось, что высокие цифры IL-18 в моче были характерны для НСМИ. При сравнительном анализе трех морфологических групп (МКГН и МезПГН из-за малочисленности были объединены в одну группу пролиферативных гломерулопатий) обнаружены статистически значимые различия уровня IL-18 в моче при отсутствии ремиссии: при НСМИ медиана составляла 122,6 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 67,8 до 468,3 пг на 1 мг креатинина, при ФСГС Me = 42,5 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 19,3 до 83,7 пг на 1 мг креатинина, при пролиферативных гломерулопатиях Me = 7,3 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 7,1 до 10 пг на 1 мг креатинина (критерий Краскела–Уоллиса; $p = 0,0004$). При последующем парном сравнении групп с использованием теста Манна–Уитни оказалось, что все выборки различаются между собой (НСМИ с ФСГС, $p = 0,04$; НСМИ с пролиферативными гломерулопатиями, $p = 0,001$ и ФСГС с пролиферативными гломерулопатиями, $p = 0,002$). После применения поправки Бонферрони статистически значимыми остались различия НСМИ и пролиферативных гломерулопатий ($p < 0,007$) и ФСГС и пролиферативных гломерулопатий ($p < 0,007$).

Уровни IL-18 в моче у стероидрезистентных пациентов с НСМИ в активной стадии и стадии неполной

ремиссии (122,6 пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 67,8 до 468,3 пг на 1 мг креатинина) значительно отличались от уровня этого показателя при НСМИ в стадии полной ремиссии ($Me = 18,2$ пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 5,4 до 91,4 пг на 1 мг креатинина) и у референтной группы ($Me = 15,5$ пг на 1 мг креатинина, интерквартильный размах от 3,2 до 32,1 пг на 1 мг креатинина) ($p = 0,04$ и $p = 0,0003$ соответственно).

При стероидрезистентном НСМИ обнаружена корреляционная связь между концентрацией IL-18 в моче и протеинурией ($r_s = 0,6$, $p = 0,02$) (рис. 3).

Стероидрезистентные пациенты с соответствующими референтными значениями IL-18 в моче в активной стадии были на момент обследования старше детей с повышением экскреции IL-18: $Me = 14$ лет, интерквартильный размах от 6,5 до 16,5 года и $Me = 5,5$ лет, интерквартильный размах от 3 до 11 лет соответственно ($p = 0,049$).

Проведенные нами исследования свидетельствуют, что IL-18, являясь провоспалительным цитокином, участвует в иммунном ответе Th 1-го типа, но он не является эксклюзивным стимулятором Th1-пути и может участвовать в Th2-иммунном ответе.

Показано, что IL-18 коррелирует с Th2-типом иммунного ответа у детей с стероидчувствительным нефротическим синдромом [7]. В другом исследовании, учитывая выявленное повышение продукции IL-18 в культуре моноцитов периферической крови пациентов по сравнению с таковым в группе контроля, авторы предположили его участие в патогенезе нефротического синдрома с минимальными изменениями [6].

По нашим данным, отмечалось значимое увеличение уровня IL-18 в моче у детей с НСМИ в активной стадии по сравнению со стадией ремиссии и референтной группой. Уровни IL-18 в моче коррелировали со степенью протеинурии у стероидчувствительных больных, отмечалась их быстрая нормализация после наступления ремиссии. Однако уровень сывороточного IL-18 у обследованных нами стероидчувствительных пациентов не превышал референтных значений ни в активной стадии, ни в стадии ремиссии. Это расходится с результатами одного из предыдущих исследований, в котором выявлялось значимое повышение уровня сывороточного IL-18 при рецидиве идиопатического нефротического синдрома по сравнению с ремиссией [3]. И может объясняться тем, что все 3 наших стероидчувствительных пациента в активной стадии были обследованы уже после назначения иммуносупрессивного лечения, следовательно, можно предположить, что при стероидчувствительном нефротическом синдроме IL-18 в крови быстро нормализуется под влиянием терапии. Так, установлено, что иммуносупрессивная терапия при тромбоцитопенической пурпуре приводит к снижению уровня IL-18 и повышению уровня IL-18-связывающего белка, известного как естественный антагонист IL-18 [8]. При нефротическом синдроме его могут продолжать еще некоторое время (до наступления ремиссии) выделять в мочу транзиторно находящиеся в почечной ткани моноциты или активированные резидентные клетки почек. С другой стороны, D. Liang и соавт. [5] не обнаружили

повышения IL-18 в крови у пациентов с идиопатическим нефротическим синдромом в активной стадии до начала терапии, что согласуется с нашими данными.

При стероидрезистентном нефротическом синдроме повышенные значения сывороточного IL-18 наблюдались в основном при пролиферативных гломерулопатиях как в активной стадии, так и в стадии неполной ремиссии, а у 1 ребенка с МКГН и в стадии полной ремиссии, что может объясняться сохранением локального гломерулярного воспаления. При пролиферативных формах гломерулопатий отмечена диссоциация между повышением концентрации IL-18 в сыворотке крови и нормальными его значениями в моче. Это, по-видимому, связано с замедлением его выведения из-за уменьшения фильтрационной поверхности. Можно также предположить наличие особенностей ренального транспорта IL-18.

Таким образом, повышение уровней IL-18 в моче при НСМИ у детей в активной стадии и снижение их после наступления ремиссии может свидетельствовать об участии IL-18 в развитии этого заболевания. Нам впервые удалось установить участие IL-18 не только в развитии НСМИ, но и в иммуногенезе других морфологических форм первичных гломерулопатий. Выявленные различия показателей IL-18 в крови и моче при НСМИ и пролиферативных гломерулопатиях указывают на разные механизмы развития этих заболеваний. Возможно также, что пути реализации иммунного ответа на повреждающее воздействие зависят от возраста больных детей. Повышение уровня IL-18 в крови у ребенка с МКГН в стадии ремиссии подтверждает необходимость длительных курсов иммуносупрессивной терапии при этой морфологической форме. Нами предложены референтные значения IL-18 в крови и моче у детей в возрасте от 3 до 16 лет. При анализе содержания IL-18 в сыворотке крови необходимо учитывать возрастные различия референтных значений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dinarello C. A. // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1998. – Vol. 856. – P. 1–11.
2. Fantuzzi G., Dinarello C. A. // J. Clin. Immunol. – 1999. – Vol. 19. – P. 1–11.
3. Kilis-Pstrusinska K., Medinska A., Zvolinska D., Wawro A. // Kidney Blood Press Res. – 2008. – Vol. 31. – P. 122–126.
4. Kohka H., Yoshino T., Iwagaki H. et al. // J. Leukocyte Biol. – 1998. – Vol. 64. – P. 519.
5. Liang D., Ma W., Yao C. et al. // Cell. Mol. Immunol. – 2006. – Vol. 3. – P. 303–306.
6. Matsumoto K., Kanmatsuse K. // Am. N. Nephrol. – 2001. – Vol. 21. – P. 20–27.
7. Printza N., Papachristou F., Tzimouli V. et al. // Cytokine. – 2008. – Vol. 44. – P. 262–268.
8. Shan N. N., Zhu X. J., Wang Q. et al. // Haematologica. – 2009. – Vol. 94. – P. 1603–1607.
9. Xu D., Trajkovic V., Hunter D. et al. // Eur. J. Immunol. – 2000. – Vol. 30. – P. 3147–3156.
10. Yoshimoto T., Mizutani H., Tsutsui N. et al. // Nat. Immunol. – 2000. – Vol. 1. – P. 132.

Поступила 02.12.11

Сведения об авторах:

Бершова Татьяна Владимировна, д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. клинической биохимии НИИ педиатрии НЦЗД; **Сергеева Тамара Васильевна**, д-р мед. наук, проф., гл. науч. сотр. нефрологического отделения НИИ педиатрии НЦЗД; **Кутафина Елена Константиновна**, ст. науч. сотр., отделение питания здорового и больного ребенка НИИ педиатрии НЦЗД