

ID: 2014-01-1276-A-3297

Оригинальная статья

Ребров А.П., Захарова Н.Б., Оксеньчук А.Н., Карпова О.Г., Патрикеева Д.А., Попыхова Э.Б.

Значение цитокинов и факторов роста в сыворотке крови и моче у больных системной красной волчанкой

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии

Введение

Клинические проявления СКВ разнообразны, поэтому большое значение имеет поиск потенциальных биомаркеров, как отражающих риск вовлечения в патологический процесс различных органов, так и являющихся чувствительными индикаторами активности заболевания [4,7].

Поражение почек при СКВ является одним из наиболее серьезных висцеритов, определяющих тяжесть заболевания и раннюю инвалидизацию больных. Клинические проявления волчаночной нефропатии встречаются в 50-70% всех случаев СКВ, тогда как морфологические признаки нефропатии обнаруживаются у 100% больных. В последнее десятилетие возрос интерес нефрологов к изучению биологических маркеров воспаления и повреждения почек: цитокинов, острофазных белков, факторов ангио- и фиброгенеза, играющих важную роль в формировании нефросклероза [1,6,8,10]. Наибольшую диагностическую значимость имеют результаты неинвазивного метода определения данных маркеров в моче [2]. Результаты этих исследований могут использоваться для выявления ранних стадий хронической болезни почек (ХБП), а также своевременного проведения адекватной терапии. В настоящее время цитокины, острофазные белки, факторы ангио- и фиброгенеза у пациентов с СКВ мало изучены.

Целью настоящей работы являлось изучение взаимосвязи изменения уровня факторов роста и цитокинов в сыворотке крови и моче больных СКВ с различным течением заболевания и активностью воспалительного процесса.

Материал и методы

Обследовано 40 пациентов с достоверным диагнозом СКВ, находившихся на обследовании и лечении в ГУЗ Областная клиническая больница (г. Саратов) в период с января по май 2013 года. Диагноз устанавливался при наличии четырех и более критериев согласно данным Американской ревматологической ассоциации (ARA, 1982). Группа исследуемых больных состояла из 39 женщин и 1 мужчины. Средний возраст пациентов составил 42,15±14,44 года. Возраст дебюта заболевания составил 31,5±15,51 год, длительность заболевания – 11,2±10 лет. Большинство пациентов имели хроническое течение – 24 (60%) больных, подострое выявлено у 9 (22,5%) больных, острое – у 7 (17,5%) пациентов. I степень активности заболевания диагностирована у 25 пациентов (62,5%), II – у 14 больных (35%) и III – у 1 больного (2,5%).

Кожные изменения (эритема по типу «бабочки», другие виды эритемы, дискоидные высыпания) зафиксированы у 19 (47,5%) пациентов; аллопеция – у 10 больных (2,5%), хейлит – у 6 пациентов (15%), стоматит – у 7 больных (17,5%), серозиты (плевриты, перикардиты) выявлены у 13 (32,5%) больных; артрит – у 28 больных (70%), синдром Рейно – у 9 пациентов (22,5%), антифосфолипидный синдром (АФС) установлен у 10 больных (25%), поражение почек в виде гломерулонефрита – у 16 (40%) пациентов, гепатоспленомегалия – у 9 (22,5%) больных, поражение сердца в виде миокардита выявлено у 4 пациентов (10%), эндокардита – у 1 больного (2,5%).

Для сравнительной оценки маркеров воспаления и повреждения почек в сыворотке крови и моче была обследована группа из 20 практически здоровых доноров, не имеющих патологии сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем, сопоставимых по полу, возрасту, индексу массы тела, уровню артериального давления с исследуемой группой больных СКВ ($p > 0,05$).

Проводился сбор анамнестических данных, объективное обследование пациентов, выполнялся комплекс общепринятых лабораторных исследований. Для количественного анализа биомаркеров взятие крови у пациентов исследуемой группы и пациентов группы сравнения проводили натощак, в утренние часы из кубитальной вены с использованием систем для забора крови "Vacuette" с активатором свертывания крови и разделительным гелем. Первую порцию утренней мочи, в объеме не менее 100 мл, собирали в специальные стаканы с крышками. Предварительно в емкость для забора мочи вносили 20 мкл раствора "ProClin 300" ("SUPELCO", США). Аликвоты сыворотки крови и мочи разливали в пробирки с крышками типа "Eppendorf" объемом 2 мл и хранили до проведения исследования при температуре -25 °С.

Концентрацию интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10), фактора некроза опухолей-альфа (ФНО- α), маркера активности воспалительного процесса моноцитарного хемоаттрактанта-1 (MCP-1), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF - Vascular endothelial growth factor) в сыворотке крови и моче исследуемых определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), используя соответствующие наборы реагентов ЗАО "Вектор-Бест" (Новосибирск). Исследование всех этих биомаркеров у больных СКВ проводили однократно. Для оценки функционального состояния почек у всех пациентов определялся креатинин сыворотки крови по методу Яффе на биохимическом анализаторе «Hitachi 912» с использованием реагентов фирмы «DiaSys», исследовался общий анализ мочи, у части больных изучалась суточная протеинурия, выполнялись проба Нечипоренко, УЗИ почек. Оценивались особенности патологии сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем.

Статистическая обработка осуществлялась с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., США) и Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Характер распределения данных оценивали графическим методом с использованием критерия Шапиро-Уилка. Описание признаков, имеющих нормальное распределение, представлено в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение; для признаков с распределением, отличным от нормального, результаты представлены в виде $Me [Q1; Q3]$, где Me – медиана, $Q1$ и $Q3$ – первый и третий квартили. Для обработки данных с распределением, отличным от нормального, применяли непараметрические методы: критерий Манна – Уитни, критерий χ^2 с поправкой Йетса. Для оценки взаимосвязи между отдельными показателями использовался корреляционный анализ с расчетом непараметрического коэффициента корреляции Спирмена. При сравнении более чем двух независимых группировок применяли методы дисперсионного анализа: параметрический дисперсионный анализ для нормально распределенных данных и ранговый анализ вариаций по Краскелу – Уоллису для данных с распределением, отличным от нормального. Различия между показателями считали значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Концентрация цитокинов и факторов ангиогенеза в сыворотке крови у пациентов с СКВ и лиц группы сравнения

Определяемый биомаркер, пг/мл	Концентрация цитокинов у пациентов с СКВ	Концентрация цитокинов у лиц группы сравнения
VEGF	243,9 [159,1; 350,6]*	45,4 [39,05; 60,25]
МСР-1	397,5 [161,7; 1118]*	60,3 [39,2; 109,4]
ФНО- α	1,01 \pm 0,4*	2,73 \pm 1,9
ИЛ-1 β	1,39 \pm 1,28*	5,4 \pm 4,3
ИЛ-6	12,15 [2,12; 15,7]*	2,89 [1,53; 3,29]
ИЛ-8	5,53 [3,10; 10,45]	6,05 [4,99; 9,20]
ИЛ-10	1,25 \pm 0,87*	2,65 \pm 1,32

Примечание: * - критерий достоверности различий между показателями больных СКВ и лиц группы сравнения ($p < 0,05$).

Таблица 2. Концентрация цитокинов и факторов ангиогенеза в моче у пациентов с СКВ и лиц группы сравнения

Определяемый биомаркер, пг/мл	Концентрация цитокинов у пациентов с СКВ	Концентрация цитокинов у лиц группы сравнения
VEGF	257,15 [126,15; 357,6]*	33,21 [18,8; 41,0]
МСР-1	313,4 [167,3; 634,5]	252,6 [156,18; 287,6]
ФНО- α	1,23 \pm 0,24*	2,6 \pm 1,13
ИЛ-1 β	1,96 \pm 2,77*	2,5 \pm 0,9
ИЛ-6	9,95 [4,28; 16,55]*	2,85 [2,08; 4,60]
ИЛ-8	17,01 [7,3; 41,37]*	8,7 \pm 13,9
ИЛ-10	1,2 \pm 0,2*	4,1 \pm 1,35

Примечание: * - критерий достоверности различий между показателями больных СКВ и лиц группы сравнения ($p < 0,05$).

Таблица 3. Концентрации цитокинов и факторов ангиогенеза в сыворотке крови и моче пациентов с различным течением СКВ и лиц группы сравнения

Исследуемые показатели, пг/мл	Группа сравнения, n=20	Острое течение, n=7	Подострое течение, n=9	Хроническое течение, n=24
VEGF сыворотки крови	45,4 [39,1; 60,3]	253,5 [168,6; 703]*	291,7 [135,9; 603,1]*	224,9 [134,5; 350,6]*
VEGF мочи	33,21 [18,8; 41,0]	299,5 [243; 774,2]**	258,6 [118,4; 306,3]**	243,3 [112,0; 396,25]**
МСР сыворотки крови	60,3 [39,2; 109,4]	570,1 [146,2; 878,9]*	397,5 [321; 1126]*	347,7 [147; 1118]*
МСР мочи	252,6 [156,2; 287]	483,4 [199,6; 795,9]	354,2 [244; 1278]**	213,3 [129,5; 549,9]
ИЛ-6 сыворотки крови	2,85 [2,08; 4,6]	13,3 [2,23; 16,2]*	4,92 [1,82; 16,7]*	12,15 [2,12; 15,65]*
ИЛ-6 мочи	2,89 [1,53; 3,29]	12,6 [3,9; 16,6]*	7,9 [4,2; 17,6]**	9,65 [4,47; 16,25]**
ИЛ-8 сыворотки крови	6,05 [4,99; 9,20]	4,66 [2,8; 7,6]*	8,75 [4,58; 21,15]*	5,53 [3,3; 9,5]*
ИЛ-8 мочи	1,07 [1,00; 11,6]	16,3 [10,8; 37,8]**	20,4 [15,2; 28,36]**	11,1 [5,20; 48,39]**

Примечание: * - критерий достоверности различий биомаркеров в сыворотке крови больных СКВ и лиц группы сравнения ($p < 0,05$);

** - критерий достоверности различий биомаркеров в пробах мочи у больных СКВ и лиц группы сравнения ($p < 0,05$).

Таблица 4. Концентрации цитокинов и факторов ангиогенеза в сыворотке крови и моче у пациентов с различной степенью активности СКВ и лиц группы сравнения

Исследуемые показатели, пг/мл	группа сравнения, n=20	I степень, n=25	II степень, n=9
VEGF сыворотки крови	45,4 [39,1; 60,3]	224,9 [112,8; 347,1]*	304,9 [160,1; 621,0]*
VEGF мочи	33,21 [18,8; 41,0]	258,6 [129,9; 376,7]**	250,5 [118,4; 322,7]**
МСР сыворотки крови	60,3 [39,2; 109,4]	430,3 [140,2; 983,95]*	442,6 [202,3; 1589,0]*
МСР мочи	252,6 [156,18; 287,0]	246,7 [169,1; 518]	451,7 [165,5; 795,9]
ИЛ-6 сыворотки крови	2,85 [2,08; 4,6]	13,2 [1,51; 15,7]	11,85 [2,31; 15,6]
ИЛ-6 мочи	2,89 [1,53; 3,29]	10,2 [4,58; 19,4]**	10,00 [3,9; 12,6]**
ИЛ-8 сыворотки крови	6,05 [4,99; 9,20]	4,85 [1,95; 7,4]*	6,8 [4,96; 25,3]*
ИЛ-8 мочи	1,07 [1,00; 11,6]	14,3 [6,5; 40,0]**	19,5 [9,05; 48,0]**

Примечание: * - критерий достоверности различий биомаркеров в сыворотке крови больных СКВ и лиц группы сравнения ($p < 0,05$);

** - критерий достоверности различий биомаркеров в пробах мочи у больных СКВ и лиц группы сравнения ($p < 0,05$).

Результаты

Нами установлено статистически значимое повышение концентрации VEGF ($p=0,001$), МСР-1 ($p=0,001$), ИЛ-6 ($p=0,01$) в сыворотке крови больных СКВ по сравнению с лицами группы сравнения. Содержание ИЛ-8 в сыворотке крови пациентов с СКВ имело тенденцию к повышению по сравнению с лицами группы сравнения, однако значимых различий не достигло ($p > 0,05$). Концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ФНО- α в сыворотке крови лиц группы сравнения оказались значимо выше, нежели у больных СКВ, результаты представлены в таблицах 1 и 2.

В моче пациентов с СКВ установлено существенное повышение уровня VEGF ($p=0,001$), ИЛ-6 ($p=0,001$) и ИЛ-8 ($p=0,01$) по сравнению с лицами группы сравнения. Концентрация МСР-1 в моче больных СКВ имела тенденцию к повышению, однако значимых различий с лицами группы сравнения не достигла ($p > 0,05$). Концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ФНО- α в моче пациентов с СКВ оказались значимо ниже, нежели в пробах мочи у лиц группы сравнения.

Изучены уровни биомаркеров в сыворотке крови и моче больных с различным течением СКВ, результаты представлены в таблице 3.

При сравнении концентрации биомаркеров в сыворотке крови пациентов с различным течением СКВ выявлены статистически значимые различия в содержании VEGF, МСР-1, ИЛ-6, ИЛ-8 по сравнению с уровнем биомаркеров у лиц группы сравнения ($p < 0,05$). В моче обнаружены статистически значимые различия в концентрации VEGF, ИЛ-6, ИЛ-8 у пациентов с острым, подострым и

хроническим течением СКВ по сравнению с аналогичными маркерами у лиц группы сравнения ($p < 0,05$). Установлено существенное повышение концентрации MCP-1 в моче у пациентов с подострым течением заболевания ($p < 0,05$).

Исследованы концентрации биомаркеров в сыворотке крови и пробах мочи у пациентов с первой и второй степенями активности СКВ (табл. 4).

В исследуемых пробах крови пациентов с I-ой степенью активности СКВ по сравнению с лицами группы сравнения обнаружено значимое повышение уровней концентрации VEGF, MCP-1, ИЛ-6, ИЛ-8 ($p < 0,05$); в пробах мочи отмечено значимое увеличение концентрации этих хемокинов, за исключением MCP-1 ($p > 0,05$). У пациентов со II-ой степенью активности в пробах сыворотки крови и мочи значимо повышены концентрации VEGF и ИЛ-8 ($p < 0,05$) по сравнению с лицами группы сравнения. При этом уровень ИЛ-6 значимо увеличивался только лишь в пробах мочи ($p < 0,05$). Концентрация MCP-1 у пациентов со II-ой степенью активности по сравнению с ее концентрацией у лиц группы сравнения значимо не изменялась ни в пробах крови, ни в пробах мочи ($p > 0,05$).

При сравнении показателей концентрации данных биомаркеров в сыворотке крови и моче между пациентами с первой и второй степенями активности значимых различий не выявлено ($p > 0,05$). Сравнительный анализ концентрации биомаркеров у пациентов с III степенью активности нами не проводился ввиду малой численности пациентов данной группы.

Проведен анализ изменений изучаемых биомаркеров сыворотки крови и мочи у больных СКВ в зависимости от проявлений самого заболевания. Значимое увеличение концентрации VEGF сыворотки крови выявлено при наличии у пациентов стоматита по сравнению с пациентами СКВ, у которых стоматит отсутствовал (422,2 [308,2;874,6] и 210,8 [119,3;347,1] соответственно, $p = 0,04$). При проведении рангового анализа между группами пациентов СКВ с различными гематологическими нарушениями, такими как анемия, тромбоцитопения, лейкопения, нами выявлено значимое изменение концентрации VEGF сыворотки крови ($n = 40$; $h = 9,6$; $p = 0,0355$). VEGF, исследуемый в пробах мочи, значимо выше у пациентов с патологией почек (гломерулонефрит и др.) по сравнению с больными СКВ, у которых патологии почек выявлено не было (292,75 [148,9;446,10] и 182,5 [118,4;245,3] соответственно, $p = 0,033$), однако при мониторинге изучаемого показателя в зависимости от варианта проявления поражения почек значимых изменений нами не выявлено ($p > 0,05$). Концентрация MCP-1 сыворотки крови значимо увеличивалась у пациентов с СКВ при наличии LE-клеток по сравнению с больными, не имеющими в крови данных клеток (876,9 [463,1;1716] и 302,4 [134,2;573,8] соответственно, $p = 0,0067$). Мониторинг концентрации интерлейкинов сыворотки крови и мочи не показал значимых изменений в зависимости от проявлений заболевания.

При проведении корреляционного анализа установлены взаимосвязи между концентрацией ФНО- α и количеством АТ к ДНК ($r = 0,414$, $p = 0,021$); ИЛ-10 и уровнем СРБ ($r = 0,359$, $p = 0,023$), ИЛ-10 и СКФ ($r = -0,322$; $p = 0,042$); ИЛ-6 сыворотки крови и длительностью заболевания ($r = 0,350$; $p = 0,027$).

Обсуждение

VEGF является одним из полипептидных белков, участвующих в воспалении и регуляции иммунного ответа, особенно при ревматических заболеваниях. В нашем исследовании данный биомаркер убедительно доказал свое участие в поддержании системного воспалительного процесса и вовлечении в него тубулоинтерстициальной ткани почек у обследуемых пациентов, на что указывает существенное повышение его уровня как в сыворотке крови, так и в пробах мочи у больных СКВ с поражением почек.

Нами не выявлено статистически значимых различий концентраций исследуемых биомаркеров у больных при различном течении заболевания и разной активности воспалительного процесса. Возможно, это связано с тем, что биологические эффекты многих цитокинов, особенно интерлейкинов, имеют высокую степень идентичности, которая создает широкие возможности для компенсации недостаточности дефицита многих медиаторов другими, а также то, что многие цитокины способны взаимодействовать со структурами одних и тех же рецепторных комплексов. Именно это обстоятельство объясняет отсутствие корреляции между содержанием тех или иных цитокинов и клиническими особенностями течения заболевания.

Одновременное нарастание в моче и сыворотке крови содержания MCP-1 и VEGF свидетельствует об активации воспалительного процесса у больных СКВ не только на уровне эпителия мочевыводящих путей, но и на уровне экстрацеллюлярного матрикса почечной паренхимы, то есть о развитии процессов тубулоинтерстициального фиброза и эндотелиальной дисфункции. В настоящее время многими исследователями придается большое значение трансдифференцировке трубчатых эпителиальных клеток в миофибробласты, которые могут активно размножаться и синтезировать вещества внеклеточного матрикса, что приводит к последующей потере функции почек. Учитывая, что моноциты/макрофаги являются основным компонентом инфильтратов почечного интерстиция, можно считать, что нарастание в моче содержания MCP-1 у больных СКВ характеризует тяжесть тубулоинтерстициального повреждения, а подъем уровня VEGF – формирование эндотелиальной дисфункции с последующей деструкцией органной архитектуры.

Уровень ИЛ-6, как провоспалительного цитокина, повышен как в сыворотке крови, так и в моче пациентов с СКВ. В нашем исследовании установлена взаимосвязь ИЛ-6 с длительностью заболевания.

Отсутствие повышения ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ФНО- α в сыворотке крови и пробах мочи пациентов с СКВ, по-видимому, может быть обусловлено проведением активной иммуносупрессивной терапии, а также длительным течением хронического воспалительного процесса.

Литература

1. Бородин А. Г., Баранов А. А., Клюквина Н. Г. и др. Клиникопатогенетическое значение фактора некроза опухоли- альфа при системной красной волчанке // Тер. арх. 2002. № 5. С. 32-33.
2. Варакин Н. А., Захарова Н. Б., Понукалин А. Н. и др. // Новости «Вектор-Бест». 2012. № 2 (64). С. 3-9.
3. Кетлинский С. А., Алексеева Т. Г., Перумов Н. Д. и др. Исследование содержания ИЛ-1 β в сыворотке крови больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом // Тер. арх. 1993. № 12. С. 51-54.
4. Лапин С. В., Тотолян А. А. Иммунологическая лабораторная диагностика ревматических заболеваний : пособие для врачей. СПб., 2006.
5. Лила А. М., Новик А. А. Роль иммунологических нарушений в патогенезе ревматических болезней // Иммунодефицитные состояния / под ред. В. С. Смирнова, И. С. Фрейдлин. СПб., 2000. С. 189-235.
6. Прокопьев А. А., Алексеева Т. Г., Зимина З. В. и др. Уровень фактора некроза опухоли в сыворотке крови больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом // Тер. арх. 1993. № 5. С. 9-12.

7. Созина А. В. Клинико-иммунологические взаимосвязи при системной красной волчанке и других диффузных болезнях соединительной ткани : автореф. дис. ... канд. мед.наук. СПб., 2007.
8. Davas E. M., Tsirogianni A., Kappou I. et al. Serum IL-6, TNF- α , p55 sr TNF - α , p75 sr TNF - α , sIL-2 α levels and disease activity in systemic lupus erythematosus // Clin. Reumatol. 1999. Vol. 18, № 1. P. 17-22.
9. Grondal G., Gunnarsson I., Ronnelid J. et al. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus // Clin. Exp. Reumatol. 2000. Vol. 18, № 5. P. 565-570.
10. Samsonov M. Y., Tilz G. P., Egorova O. et al. Serum soluble markers of immune activation and disease activity in systemic lupus erythematosus // Lupus. 1994. Vol. 4. P. 29-32.