

Повышенная экскреция трансформирующего фактора роста- β с мочой – ранний маркер нефропатии у больных сахарным диабетом 1 типа

И.А. Бондарь¹, В.В. Климонтов¹, А.П. Надеев²

¹Кафедра эндокринологии (зав. – проф. И.А. Бондарь),

²Кафедра патологической анатомии (зав. – акад. РАМН В.А. Шкурупий)
Новосибирского государственного медицинского университета

Нефросклероз – основная причина функциональной недостаточности почек у пациентов с сахарным диабетом (СД). Главным патогенетическим фактором, запускающим процесс склерозирования почечных клубочков и интерстиция при СД, является гипергликемия. Ее эффект реализуется через изменение экспрессии ряда цитокинов и факторов роста. Под контролем последних находится синтетическая функция клубочковых и канальцевых клеток, аккумуляция и распад компонентов межклеточного матрикса (коллагена, гликозаминогликанов, фибронектина и др.) [1, 2].

Центральную роль в развитии нефросклероза играет трансформирующий фактор роста- β (ТФР- β) [3, 4]. ТФР- β – мультифункциональный цитокин, впервые выделенный из тромбоцитов в 1990-х гг. Он является важным регулятором клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, иммунного ответа, ремоделирования внеклеточного матрикса [5]. ТФР- β синтезируется многими резидентными клетками органов, а также инфильтрирующими лейкоцитами. Почти все типы почечных клеток могут продуцировать данный фактор [6].

В единичных клинических исследованиях обнаружено возрастание мочевой экскреции ТФР- β у больных с диабетической нефропатией (ДН) [7, 8]. Взаимосвязь продукции ТФР- β с аккумуляцией межклеточного матрикса в почках и формированием нефросклероза у пациентов с СД не изучена.

Целью нашей работы являлось изучение экскреции ТФР- β с мочой у больных СД 1 типа в сопоставлении с качеством гликемического контроля, структурными и функциональными изменениями в почках.

Материалы и методы исследования

Почечная экскреция ТФР- β исследована у 54 больных СД 1 типа, в том числе у 24 мужчин и у 30 женщин. Возраст обследованных от 16 до 54 лет

(средний возраст 29,6 $\pm$ 9,7 года). Длительность СД варьировала от 1 мес до 31 года, составляя в среднем 7,3 $\pm$ 7,1 года. В исследование не включались больные с заболеваниями почек недиабетического генеза, кетоацидозом, обострением сопутствующих заболеваний. Комплекс нефрологического обследования включал исследование суточной протеинурии, альбуминурии, мочевого осадка, креатинина крови с расчетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по Cockcroft-Gault, УЗИ почек.

У 24 пациентов выявлена нормоальбуминурия (1-я группа), у 20 – микроальбуминурия (2-я группа) и у 10 – клинически выраженная ДН (3-я группа). Нарушение клиренса креатинина имело место у 6 больных 3-й группы (СКФ 10,6–59,5 мл/мин). Клинико-лабораторная характеристика больных разных групп представлена в табл. 1. Пациенты с выраженной нефропатией в целом были несколько старше, имели большую длительность СД и, по определению, более высокие показатели протеинурии и креатинина и меньшую СКФ по сравнению с больными других групп. Прослеживалась тенденция к увеличению уровней гликированного гемоглобина от 1-й к 3-й группе, однако эти различия не были статистически значимыми.

Исследование содержания ТФР- β проводили в утренней порции мочи методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов «Bender MedSystems» (Австрия) с использованием планшеточного ридера «BioRad 680» («BioRad», США) и программного обеспечения «Zemfira». Результаты определения приводили к величине экскретируемого креатинина и сравнивали с таковыми в контрольной группе. Последнюю составили 11 здоровых лиц от 21 до 54 лет (5 мужчин и 6 женщин, средний возраст 26,7 $\pm$ 13,2 года). Исследования содержания ТФР- β проведены в гормональной лаборатории МЦ «Лабораторная диагностика» (зав. лабораторией – к.м.н. В.В. Романов).

Таблица 1

Характеристика групп больных СД с различными стадиями нефропатии			
Показатель	Группы больных		
	1-я (n=24)	2-я (n=20)	3-я (n=10)
Пол, м/ж	9/13	10/10	3/7
Возраст, годы	27,2±8,8	28,4±8,3	38,3±10,4**
Длительность СД, годы	3,6±3,9	7,5±6,2*	16,2±8,9**
HbA1c, %	9,5±3,2	10,0±1,6	10,8±2,5
Гликемия натощак, ммоль/л	8,1±2,7	9,7±3,5	9,4±2,4
Гликемия через 2 часа после еды, ммоль/л	9,1±2,7	10,0±2,6	10,3±2,5
Протеинурия, г/сут	-	0,2±0,1	2,2±2,3**
Креатинин крови, мкмоль/л	80,9±12,5	82,2±10,0	239,6±222,8**
СКФ, мл/мин	103,0±30,5	103,2±18,8	55,2±35,9**

* $p < 0,05$ – при сравнении с 1-й группой больных;

** $p < 0,05$ – при сравнении с 1-й и 2-й группой.

Прижизненное морфологическое исследование почек проведено у 22 пациентов с нормальной фильтрационной функцией почек, в том числе у 11 с нормоальбуминурией, 10 – с микроальбуминурией и у одной пациентки с протеинурией (0,8 г/сут). Процедура выполнялась под контролем УЗИ в отделении ультразвуковой диагностики (зав. – А.В. Сасин) Новосибирской Государственной областной клинической больницы. Пациенты давали письменное информированное согласие на проведение биопсии. Морфологическое исследование почек включало светооптическую микроскопию срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, ШИК-реакцией, по ван Гизон, а также электронную микроскопию ультратонких срезов толщиной 35–45 нм. Для количественной оценки выраженности изменений в почках применяли морфометрию. Соотношение объем мезангия/объем клубочка определяли с помощью окулярной сетки на 289

точек (Г.Г. Автандилов, 1990). Морфометрию структурных компонентов нефрона проводили при увеличении электронного микроскопа в 38000, определяли толщину базальных мембран клубочков и проксимальных канальцев, количество и среднюю толщину малых отростков подоцитов.

В качестве контроля при проведении световой микроскопии использовали почки 15 здоровых лиц, погибших от черепно-мозговых травм (автокатастрофы). При судебно-медицинском исследовании этих лиц не выявлено признаков хронических заболеваний, отравлений, травматических и иных повреждений почек. Образцы почек забирали не позднее 24 ч от момента биологической смерти. При проведении электронно-микроскопических исследований в качестве контроля использовали неизмененные фрагменты почек 5 больных с нефрокарциномами. При клиническом обследовании этих лиц были исключены нарушения углеводного обмена, артериальная гипертензия, инфекции мочевыводящих путей и другие заболевания, которые могут оказывать влияние на структуру и функцию почек. Образцы почек для исследования забирали во время извлечения почки.

Протокол исследования одобрен этическим комитетом Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 1/11 от 16. 11. 2005 г.).

Статистическая обработка проведена с использованием пакета STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Применяли дисперсионный анализ (ANOVA), корреляционный анализ, многофакторный регрессионный пошаговый анализ. Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро–Уилкса, различия оценивали по критерию Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Данные представлены как средние и стандартные отклонения ($M \pm SD$).

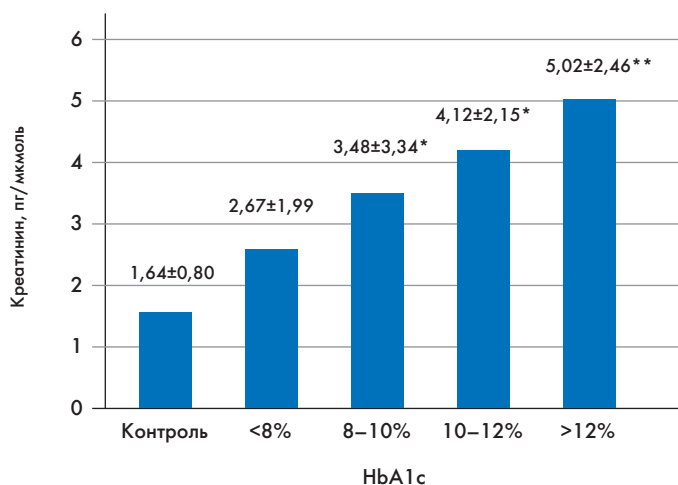


Рис. 1. Экскреция с мочой ТФР-β у больных СД 1 типа в зависимости от уровня HbA1c:
 $p < 0,002$ – при сравнении с контролем

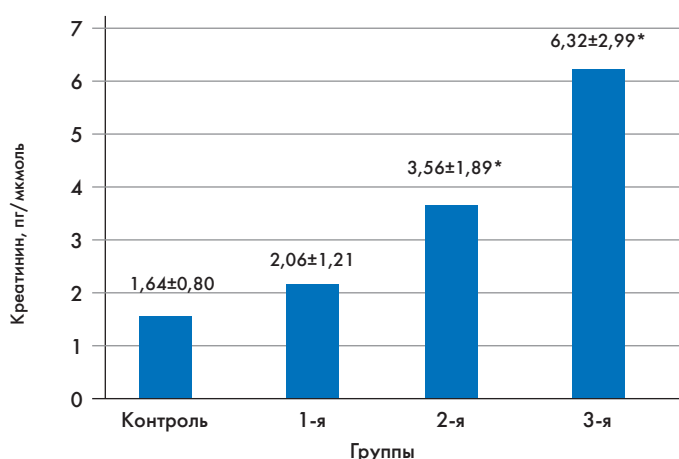


Рис. 2. Экскреция с мочой ТФР- β у больных СД 1 типа в зависимости от выраженности ДН:
* $p < 0,02$ – при сравнении с контролем и 1-й группой больных

Результаты и их обсуждение

Экскреция ТФР- β с мочой у больных СД варьировала от 0,47 до 12,06 $\mu\text{г/мкмоль}$ креатинина, составляя в среднем $3,41 \pm 2,42$ $\mu\text{г/мкмоль}$. В контрольной группе экскреция ТФР- β составила $1,64 \pm 0,80$ $\mu\text{г/мкмоль}$ (колебания от 0,61 до 3,18 $\mu\text{г/мкмоль}$). Таким образом, средняя экскреция ТФР- β у больных оказалась в 2,1 раза выше, чем в контроле ($p = 0,02$).

Экскреция ТФР- β коррелировала с длительностью СД ($r = 0,30$, $p = 0,03$) и с возрастом больных ($r = 0,33$, $p = 0,01$). Положительная взаимосвязь обнаружена между концентрацией ТФР- β и уровнем гликированного гемоглобина ($r = 0,34$, $p = 0,03$). Экскреция ТФР- β увеличивалась по мере нарастания концентрации HbA1c (рис. 1). Наибольшие значения зафиксированы при уровне HbA1c > 12%.

Зависимость экскреции ТФР- β от стадии ДН представлена на рис. 2. У пациентов с нормоальбуминурией средняя экскреция ТФР- β достоверно не отличалась от нормы ($p = 0,30$). У больных с микроальбуминурией выделение ТФР- β было увеличено в среднем в 2,2 раза ($p = 0,003$). У больных с протеинурией экскреция ТФР- β превышала норму в 3,9 раза ($p = 0,00008$). Группы больных с микро- и макроальбуминурией имели достоверно более высокую экскрецию ТФР- β в сравнении с пациентами с нормальной ЭАМ ($p = 0,003$, $p = 0,000001$ соответственно).

Взаимосвязь экскреции ТФР- β с выраженностью ДН подтверждена при корреляционном анализе. Положительные корреляции обнаружены между экскрецией ТФР- β и суточной протеинурией ($r = 0,29$; $p = 0,03$), уровнем креатинина ($r = 0,32$; $p = 0,02$), мочевины ($r = 0,37$; $p = 0,006$). Содержание ТФР- β обратно коррелировало с СКФ ($r = -0,36$; $p = 0,007$).

При исследовании биоптатов почек у обследованных больных выявлены изменения, свойственные начальным стадиям ДН: гипертрофия и гиперклеточность клубочков, очаговое расширение мезангия, расширение просвета и утолщение стенок капиллярных петель, перигломерулярный склероз, утолщение и частичное слияние малых отростков подоцитов, неравномерное утолщение базальных мембран, дистрофические и атрофические изменения эпителия канальцев, начальные этапы склероза интерстиция и артериол. При морфометрическом анализе обнаружено достоверное увеличение соотношения мезангий/клубочек, значительное увеличение толщины клубочковых и канальцевых базальных мембран, а также толщины малых отростков подоцитов в сравнении с контролем (табл. 2).

При сопоставлении экскреции ТФР- β с морфологическими изменениями в почках установлена положительная корреляция между концентрацией ТФР- β и относительным объемом мезангия ($r = 0,34$; $p = 0,12$). Наиболее тесные взаимосвязи выявлены между ТФР- β и толщиной базальной мембраны клубочков ($r = 0,64$; $p = 0,004$) и канальцев ($r = 0,86$; $p < 0,00001$). Кроме того, экскреция ТФР- β была взаимосвязана с шириной малых отростков подоцитов ($r = 0,44$; $p = 0,04$).

С помощью многофакторного пошагового регрессионного анализа изучена зависимость экскреции ТФР- β от возраста пациентов, длительности СД, стадии нефропатии, показателей гликемии натощак и после еды, гликированного гемоглобина, протеинурии, креатинина и СКФ. Наиболее значимое влияние на экскрецию ТФР- β оказывала выраженность ДН (параметры модели: $\beta = 0,77$; $\beta_0 = 3,47$; $R^2 = 0,39$; $F = 8,2$; $p = 0,0004$). Самостоятельного влияния остальных факторов не установлено.

Полученные результаты свидетельствуют о тесной взаимосвязи между продукцией ТФР- β и развитием нефропатии у пациентов с СД 1 типа. Наблюдаемое нами значительное возрастание мочевого экскреции ТФР- β соответствует результатам работ, авторы которых зафиксировали повышение экспрессии гена ТФР- β в почках при СД [3, 9–12]. Помимо возрастания продукции самого ТФР- β , в «диабетических» почках возрастает экспрессия рецепторов ТФР- β типа I [13] и типа II [13, 14], что создает условия для реализации патогенного действия данного фактора.

В настоящее время ТФР- β рассматривается как один из ключевых медиаторов в развитии нефросклероза. Его эффект связан с изменением обмена межклеточного матрикса. Активируя синтез коллагена и других компонентов матрикса (фибронектина, ламинина), ТФР- β способствует развитию гипертрофии клубочков, утолщению базальных мембран и увеличению мезангия при СД [3, 4]. Кроме того, ТФР- β ускоряет развитие фиброза интерстиция за

Таблица 2

Результаты морфометрического анализа структур почек больных СД			
Параметр	Больные СД	Контроль	p
Отношение мезангий/ клубочек, %	23,5±5,1	17,2±2,9	0,03
Толщина клубочковой базальной мембраны, нм	569±139	338±50	0,002
Средняя толщина малых отростков подоцитов, нм	849±543	438±54	0,11
Толщина базальной мембраны проксимальных канальцев, нм	829±162	580±63	0,003

счет стимуляции синтеза матрикса эпителиоцитами канальцев и интерстициальными фибробластами [10, 15]. Профиброгенные свойства ТФР-β усиливаются его стимулирующим действием на синтез фактора роста соединительной ткани, который оказывает сходные с ТФР-β эффекты [15, 16]. Еще один механизм реализации профиброгенного действия ТФР-β состоит в подавлении синтеза матриксных металлопротеиназ – ферментов, расщепляющих межклеточный матрикс [17].

Полученные нами данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи между качеством гликемического контроля и концентрацией ТФР-β в моче. Это согласуется с результатами исследований *in vitro*, показавшими, что гипергликемия запускает синтез ТФР-β в клетках почечных клубочков и канальцев [4, 12]. Введение инсулина животным с экспериментальным СД уменьшало выраженность изменений экспрессии гена ТФР-β в почках [12]. Это подтверждает значимость гипергликемии при возникновении изменений синтеза ТФР-β. Дисбаланс в продукции ТФР-β можно рассматривать как связующее патогенетическое звено между гипергликемией и нефросклерозом.

Как показало проведенное исследование, моче-вая экскреция ТФР-β у больных СД 1 типа взаимосвязана со структурными и функциональными изменениями в почках. Повышение экскреции ТФР-β начинается уже на доклинических стадиях ДН. На этих стадиях содержание ТФР-β отражает выраженность ранних морфологических изменений в почках. В частности, нами отмечена взаимосвязь между повышенным содержанием ТФР-β и такими характерными признаками ДН, как утолщение гломерулярных и тубулярных базальных мембран, расширение малых отростков подоцитов, увеличение объема мезангия. Наибольшая экскреция ТФР-β зафиксирована у пациентов с выраженной ДН. У этих больных содержание фактора роста в моче возрастает обратно пропорционально снижению фильтрационной и азотвыделительной функции почек. Таким образом, определение экскреции ТФР-β с мочой можно использовать в качестве неинвазив-

ного теста для ранней диагностики и мониторингирования течения ДН. Возможно, исследование ТФР-β окажется полезным и в прогнозировании развития диабетического нефросклероза, однако это предположение нуждается в проверке в проспективных исследованиях.

Полученные данные ставят вопрос о подходах к коррекции синтеза ТФР-β у пациентов с СД. Безусловно, поддержание нормогликемии является важным условием для предотвращения активации синтеза данного фактора при СД. В экспериментальных работах показано, что ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и антагонисты рецепторов ангиотензина II тормозят почечный синтез ТФР-β и предупреждают утолщение базальных мембран и расширение мезангия при диабете [10, 11, 18]. Это соответствует представлениям об ангиотензине II как о стимуляторе синтеза ТФР-β в почках [19]. Имеются данные, что двойная блокада ренин-ангиотензиновой системы с помощью ингибитора АПФ и антагониста рецепторов ангиотензина II (рамиприл + кандесартан) оказывает более выраженный антипротеинурический эффект и приводит к более выраженному снижению экскреции с мочой ТФР-β у больных СД 2 типа с протеинурией [20].

С воздействием на синтез и рецепцию ТФР-β связаны некоторые перспективные подходы к лечению ДН. Показано, что введение антител к ТФР-β животным с СД уменьшает синтез компонентов межклеточного матрикса [21], выраженность морфологических изменений в клубочках и предупреждает снижение функции почек [3]. Обнадешивающие результаты дало использование траниласта – ингибитора синтеза коллагена, взаимодействующего с ТФР-β. По предварительным данным, препарат подавляет образование коллагена и замедляет снижение функции почек у пациентов с СД и выраженной нефропатией [22]. Синтез ТФР-β и коллагена в почках снижают антагонисты эндотелиновых рецепторов [23] и блокаторы гликации альбумина [24]. Установление клинической эффективности данных препаратов в лечении ДН – задача будущих исследований.

Выводы

1. Развитие диабетической нефропатии у больных СД 1 типа сопровождается значительным увеличением экскреции ТФР- β с мочой. Наиболее высокие значения экскреции наблюдаются у больных с протеинурией.

2. Мочевая экскреция ТФР- β у больных СД 1 типа связана со степенью компенсации углеводного обмена, альбуминурией, фильтрационной и азотвыделительной функцией почек.

3. Содержание ТФР- β в моче у больных с ранними стадиями диабетической нефропатии отражает выраженность морфологических изменений в почках: утолщение гломерулярных и тубулярных базальных мембран, расширение малых отростков подоцитов, увеличение объема мезангия.

Литература

1. Бондарь ИА, Климонтов ВВ Роль дисфункций клубочковых клеток в развитии диабетической нефропатии. // Пробл эндокринол 2006; 4: 45-49
2. Дедов ИИ, Шестакова МВ Диабетическая нефропатия. М: Универсум паблишинг, 2000
3. Chen S, Jim B, Ziyadeh FN Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. // Semin Nephrol 2003; 23 (6): 532-543
4. van Det NF, Verhagen NA, Tamsma JT, et al. Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor-beta by high glucose, not by angiotensin II. // Diabetes 1997; 46 (5): 834-840
5. Bottinger EP, Bitzer M TGF- signaling in renal disease. // J Am Soc Nephrol 2002; 13: 2600-2610
6. Ando T, Okuda S, Yanagida T, et al. Localization of TGF and its receptors in the kidney. // Miner Electrolyte Metab 1998; 24 (1-2): 149-153
7. Korpinen E, Teppo AM, Hukkanen L, et al. Urinary transforming growth factor-beta1 and alpha1-microglobulin in children and adolescents with type 1 diabetes. // Diabetes Care 2000; 23 (5): 664-668
8. Sato H, Iwano M, Akai Y, et al. Increased excretion of urinary transforming growth factor beta 1 in patients with diabetic nephropathy. // Am J Nephrol 1998; 18 (6): 490-494
9. Craven PA, DeRubertis FR, Kagan VE, et al. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF-beta, and glomerular size in diabetes. // J Am Soc Nephrol 1997; 8 (9): 1405-1414
10. Gilbert RE, Cox A, Wu LL, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. // Diabetes 1998; 47 (3): 414-422
11. Kalender B, Ozturk M, Tuncdemir M et al. Renoprotective effects of valsartan and enalapril in STZ-induced diabetes in rats. // Acta Histochem 2002; 104 (2): 123-130
12. Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. // Diabetes 1997; 46 (3): 473-780
13. Kang MJ, Ingram A, Ly H, et al. Effects of diabetes and hypertension on glomerular transforming growth factor-beta receptor expression. // Kidney Int 2000; 58 (4): 1677-1685
14. Hill C, Logan A, Smith C, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitor suppresses glomerular transforming growth factor beta receptor expression in experimental diabetes in rats. // Diabetologia 2001; 44 (4): 495-500
15. Kobayashi T, Inoue T, Okada H, et al. Connective tissue growth factor mediates the profibrotic effects of transforming growth factor-beta produced by tubular epithelial cells in response to high glucose. // Clin Exp Nephrol 2005; 9 (2): 114-121
16. Wang S, Denichilo M, Brubaker C, Hirschberg R Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy. // Kidney Int 2001; 60 (1): 96-105
17. McLennan SV, Fisher E, Martell SY, et al. Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. // Kidney Int Suppl 2000; 77: S81-S87
18. Davis BJ, Forbes JM, Thomas MC, et al. Superior renoprotective effects of combination therapy with ACE and AGE inhibition in the diabetic spontaneously hypertensive rat. // Diabetologia 2004; 47 (1): 89-97
19. Singh R, Alavi N, Singh AK, et al. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. // Diabetes 1999; 48 (10): 2066-2073
20. Song JH, Cha SH, Lee HJ, et al. Effect of low-dose dual blockade of renin-angiotensin system on urinary TGF-beta in type 2 diabetic patients with advanced kidney disease. // Nephrol Dial Transplant 2006; 21 (3): 683-689
21. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, et al. Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. // Diabetes 1997; 46 (5): 854-859
22. Soma J, Sugawara T, Huang YD, et al. Tranilast slows the progression of advanced diabetic nephropathy. // Nephron 2002; 92 (3): 693-698
23. Cosenzi A, Bernobich E, Trevisan R, et al. Nephroprotective effect of bosentan in diabetic rats. // J Cardiovasc Pharmacol 2003; 42 (6): 752-756
24. Cohen MP, Ziyadeh FN, Hong SW, et al. Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF-beta1. // Kidney Int 2002; 61 (6): 2025-2032