

инсулину, что диктует необходимость поиска новых методов терапии.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. У больных, страдающих хроническими формами ИБС и ожирением, отмечаются повышенные уровни инсулина и лептина в крови по сравнению со здоровыми лицами того же возраста.

2. Резистентность к инсулину и лептину на фоне метаболического синдрома усиливает атерогенный потенциал крови, что в клиническом плане может способствовать прогрессированию ИБС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению*

метаболического синдрома: 2-й пересмотр. – М., 2009. – 28 с.

2. *Frayn K.N.* Adipose tissue and the insulin resistance syndrome // *Proc. Nutr. Soc.* – 2001. – Vol. 60, N 3. – P. 375–380.
3. *Lago F.* Adipokines as novel modulators of lipid metabolism // *Trends Biochem. Sci.* – 2009. – Vol. 34, N 10. – P. 500–510.
4. *Mantzoros C.S.* The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – Vol. 130. – P. 671–680.
5. *Matthews D.R.* Homeostasis model assessment (HOMA): insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // *Diabetologia.* – 1985. – Vol. 28. – P. 412–419.
6. *Waki H., Tontonoz P.* Endocrine functions of adipose tissue // *Ann. Pathol.* – 2007. – N 2. – P. 31–56.

УДК 616.61-002-007:612.017]-076.5-053.2(045)

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ И МОЧИ У ДЕТЕЙ С ОБСТРУКТИВНЫМИ УРОПАТИЯМИ

© Глыбочко П.В., Морозов Д.А., Свистунов А.А., Морозова О.Л., Захарова Н.Б., Шахпазян Н.К.

НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии
Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского, Саратов
E-mail: morozova_ol@list.ru

Изучен цитокиновый профиль (ИЛ1 β , 6,8 ФНО α , 4,10) сыворотки крови и мочи методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем «Bender Medsystems» (Австрия) и «Вектор-Бест» (Россия, Новосибирск) в динамике заболевания у 80 детей с различными вариантами обструктивных уропатий. Получено, что даже при отсутствии клинических проявлений хронического обструктивного пиелонефрита имеются достоверные изменения цитокинового профиля, при обострении заболевания отмечается дисбаланс цитокинов с преобладанием провоспалительных фракций. Мониторинг цитокинов - перспективный неинвазивный метод оценки воспалительного процесса в мочевыводящих путях.

Ключевые слова: цитокины, обструктивные уропатии, дети.

THE CYTOKINES LEVELS IN BLOOD AND IN URINE AMONG CHILDREN WITH OBSTRUCTIVE UROPATHY

Glybochko P.V., Morozov D.A., Svistunov A.A., Morozova O.L., Zakharova N.B., Shakhpazyan N.K.

RSI of the Fundamental and Clinical Uronephrology of the V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov

The aim of the study was to analyze the level of cytokines (IL1 β , 6, 8 TNF- α ,4,10) in blood and in urine using the enzyme-linked immunosorbent assaying based on the test-systems "Bender Medsystem" (Austria) and "Vektor – Best" (Russia, Novosibirsk) in dynamics of disease among 80 children with different variants of obstructive uropathy. It was found that though there are no clinical manifestations of chronic obstructive pyelonephritis the reliable changes of cytokines levels could be seen while in acute phase of the disease was mentioned the imbalance of cytokines with the predominance of pro-inflammatory fractions. The monitoring of cytokines is a perspective and non-invasive method of evaluation of inflammatory process in urinary tracts.

Keywords: cytokines, obstructive uropathy, children.

Экспериментальными и клиническими исследованиями последних лет установлена ведущая роль биологически активных соединений - цитокинов в развитии и прогрессировании обструктивных уропатий (ОУ) у детей [1, 4, 6]. В настоящее время интерес исследователей вызывают цитокины и факторы роста, которые являются ключевыми в течение эмбрионального развития и постнатального роста тканей, контролирующими процессы клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, участвующими в процессах воспаления и регенерации тканей [3, 5, 7]. Однако до настоящего времени недостаточно изучена степень участия этих биологических маркеров в развитии и прогрессировании поражения почек при обструктивных уропатиях у детей [8]. Отсутствуют данные о мониторинге активности хронического обструктивного пиелонефрита (ХОП) при различных вариантах патологии на основании анализа цитокинового профиля крови и мочи.

Целью нашего исследования стало изучение цитокинового профиля крови и мочи у детей с различными вариантами обструктивных уропатий, определение диагностической значимости

различных цитокинов в оценке степени выраженности воспалительного процесса в мочевыводящих путях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучен цитокиновый профиль (ИЛ1 β , 6,8 ФНО α , 4,10) у 80 детей с обструктивными уропатиями. В зависимости от уровня обструкции мочевыводящих путей все больные были разделены на две группы: в 1-ю группу вошли 40 детей с гидронефрозом (обструкция пиелоуретерального сегмента), 2-ю группу составили 40 детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом (ПМР). В 1-й группе больных коррекция обструктивного синдрома проводилась путем ревизии пиелоуретерального сегмента по методике Хайнца-Андерсена – Кучера. Во 2-й группе эндоскопическая коррекция устья мочеточника: по методике subureteral transureteral intjection (STING) -16, hydrodistention implantation technique (HIT) – 14, implantation periureteral transpositional (IPT) – 10. Коррекция ПМР по методике STING выполнялась при ПМР 2-3-й степени преимущественно у детей

до 2 лет, НИТ и ИРТ методики использовались при ПМР 3-4-й степени. Эндоскопическая коррекция путем эндоимплантации биостабильного препарата ДАМ+ выполнена у 26 больных с ПМР (65%) и биодеградируемого препарата коллаген – у 14 больных с ПМР. Средний возраст больных в обеих группах составил 5,1 + 4,6 года. Группу контроля составили 20 детей с малой хирургической патологией (пупочной или паховой грыжей) в предоперационном периоде, стратифицированных по возрасту и полу.

Констатация обструктивной уropатии производилась на основании стандартного рентгеноурологического обследования (экскреторной урографии и микционной цистоуретерографии) и ультразвукового исследования с доплерографией. В случае необходимости дополнительно проводилась нефросцинтиграфия с целью динамической оценки экскреторной функции почек.

В зависимости от наличия клинических проявлений ХОП больные внутри каждой группы были разделены на две подгруппы. В подгруппу А входили пациенты в стадии ремиссии ХОП (атаки пиелонефрита в анамнезе), в подгруппу Б отнесены дети, у которых произошло обострение ХОП с характерной клинической картиной (лихорадкой, лейкоцитозом, бактериурией, пиурией), потребовавшее оперативного вмешательства.

Всем пациентам исследуемых групп и группы сравнения был выполнено количественное определение цитокинов (ИЛ1 β , 6,8 ФНО α , 4,10) в образцах сыворотки крови и мочи методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем «Вектор-Бест» (Россия, Новосибирск) (ИЛ-1 β , 6, 8, ФНО α , 4) и ИЛ 10 с применением наборов «Bender Medsystems» (Австрия) на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2010 (Stat Fax, США) в динамике заболевания.

Забор крови и мочи для анализа проводился при поступлении, с целью оценки исходного уровня активности воспалительного процесса, а также на 3-5-й день после оперативного вмешательства. Кровь для получения сыворотки забиралась в утренние часы до приема пищи из подкожных вен локтевого сгиба. Для сбора крови и получения сыворотки использовалась система Vacutainer, состоящая из стерильной двусторонней полый иглы для забора венозной крови, пластикового фиксатора для иглы и вакуумной пробирки Vacutette объемом 4 мл с активатором коагуляции. Свернувшаяся кровь центрифугировалась в течение 15 минут при 3000 оборотов в минуту (на центрифуге ЦЛМН-Р10-01-«Элекон»). Полученную сыворотку разливали на аликвоты по 0,5 мл в полипропиленовые пробирки «Эппендорф» (Германия), замораживали и хранили при -18°C до проведения исследования, но не более

трех месяцев. Моча для проведения исследования после гигиенического туалета наружных половых органов собиралась в специальный контейнер, далее центрифугировалась при 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут (на центрифуге ЦЛМН-Р10-01-«Элекон»), а надосадочная жидкость замораживалась в полипропиленовых пробирках «Эппендорф» и хранилась при – 18°C до проведения анализа. Непосредственно перед анализом образцы биоматериала размораживались при комнатной температуре, перемешивались и центрифугировались 5 минут при 3000g на микроцентрифуге Elmi (Sky Line, Латвия).

В наборах тест-систем «Bender Medsystems» (Австрия) и «Вектор-Бест» (Россия, Новосибирск) использован «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта используются два моноклональных антитела с различной эпитропной специфичностью к соответствующему цитокину. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с соответствующим конъюгатом. На первой стадии анализа цитокин, содержащийся в калибровочных и исследуемых пробах, связывается с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа, иммобилизованный цитокин взаимодействует с конъюгатом вторых антител. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству цитокина в исследуемом образце. Во время инкубации с субстратной смесью происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся меченых антител. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация цитокина, селектина и т.д. в определяемых образцах. Количество выражается в пг/мл; нг/мл.

Статистический анализ результатов обследования и лечения пациентов проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 for Windows корпорации StatSoft-Russia (1999) [2].

Формирование анализируемой выборки проводилось в режиме проспективной рандомизации. Анализируемые признаки были разделены на количественные (непрерывные и дискретные). При анализе количественных данных определяли вид их распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка при исходно неизвестных среднем значении и среднем квадратичном отклонении признака. По результатам анализа принимали нулевую (распределение исследуемого признака в генеральной совокупности соответствует закону нормального распределения) или альтернативную (распределение исследуемого признака в ге-

неральной совокупности не соответствует закону нормального распределения) гипотезы распределения признака. Для сравнения выборок по количественным признакам использовали критерии знаков и Вилкоксона для парных сравнений.

Критический уровень статистической значимости (p) был принят за 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов показал, что в 1-й группе больных с гидронефрозом даже при отсутствии клинической картины воспалительного процесса по стандартным клинико-лабораторным показателям в подгруппе 1А ($n=24$) до операции было обнаружено достоверное увеличение уровня ИЛ 6, 8, в крови и моче по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1). ФНО α был увеличен только в сыворотке крови. В подгруппе 1Б ($n=16$) с клиническим обострением воспалительного процесса до операции было зарегистрировано значимое увеличение всех провоспалительных цитокинов (ИЛ 1 β , 6, 8, ФНО α) при отсутствии достоверных изменений со стороны противовоспа-

лительных цитокинов (ИЛ 4, 10) (табл. 1). Сравнительный внутригрупповой анализ показал, что до коррекции ОУ в подгруппе 1Б при обострении ХОП наблюдались более выраженные сдвиги провоспалительных фракций в крови и моче по сравнению с показателями подгруппы 1А в стадии ремиссии ХОП, адекватный ответ со стороны противовоспалительных цитокинов отсутствовал в обеих подгруппах (табл. 1).

На 3-5-е сутки после проведения оперативного лечения гидронефроза у больных 1 группы в подгруппе 1А ($n=24$) имелось сбалансированное увеличение как про- (ИЛ 1 β , 6, 8), так и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и моче (ИЛ 4, 10) (табл. 2). В подгруппе 1Б ($n=16$) в послеоперационном периоде регистрировалось повышение уровня только провоспалительных цитокинов (ИЛ 6, 8), а в моче – не только увеличение содержания ИЛ 1 β , 6, 8, но и противовоспалительного ИЛ4 (табл. 2). При сравнении показателей течения послеоперационного периода в обеих подгруппах в подгруппе 1Б наблюдались более выраженные сдвиги провоспалительных цитокинов в крови и моче.

Таблица 1

Уровень цитокинов у больных 1-й группы до коррекции гидронефроза

Показатель	Группа контроля (n=20)		Подгруппа 1А с ремиссией ХОП (n=24)			Подгруппа 1Б с обострением ХОП (n=16)			
			Исходный уровень до операции			Исходный уровень до операции			
	М	SD	М	SD	p-level	М	SD	p-level	p *-level
Кровь									
ИЛ 1 β , пг/мл	3,58	3,07	6,91	3,33	0,067	7,23	72,12	0,03	0,09
ИЛ 6, пг/мл	1,65	2,17	3,45	14,48	0,022	38,4	314,81	0,0004	0,008
ИЛ 8, пг/мл	10,75	14,40	24,50	29,90	0,016	268,8	259,67	0,001	0,0005
ФНО α , пг/мл	2,89	3,12	3,16	1,25	0,040	4,33	37,98	0,040	0,003
ИЛ 4, пг/мл	1,81	0,81	1,93	2,57	0,255	2,08	2,25	0,255	0,33
ИЛ 10, пг/мл	3,64	2,72	7,29	8,92	0,262	8,56	11,58	0,06	0,96
Моча									
ИЛ 1 β , пг/мл	3,74	4,46	6,34	19,50	0,910	15,99	86,20	0,002	0,03
ИЛ 6, пг/мл	2,37	1,95	6,14	130,88	0,015	82,70	157,27	0,0005	0,007
ИЛ 8, пг/мл	6,05	3,64	26,70	161,26	0,001	191,00	243,03	0,0004	0,02
ФНО α , пг/мл	2,33	1,90	3,28	3,70	0,167	3,78	1,69	0,167	0,26
ИЛ 4, пг/мл	1,63	1,99	2,70	3,01	0,262	3,99	3,91	0,262	0,38
ИЛ 10, пг/мл	2,45	5,32	5,30	10,21	0,331	5,32	8,78	0,06	0,50

Примечания:

М – медиана.

SD – среднеквадратичное стандартное отклонение, указывающее на разброс данных по интервалу значения признака относительно медианы.

p-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям контрольной группы.

p *-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям подгруппы с ремиссией ХОП.

Динамика цитокинов у больных 1-й группы после коррекции гидронефроза

Показатель	Группа контроля (n=20)		Подгруппа 1А с ремиссией ХОП (n=24)			Подгруппа 1Б с обострением ХОП (n=16)			
			3-5-е сутки после операции			3-5-е сутки после операции			
	М	SD	М	SD	p-level	М	SD	p-level	p *-level
Кровь									
ИЛ 1β, пг/мл	3,58	3,07	6,25	3,99	0,044	6,43	4,23	0,097	0,28
ИЛ 6, пг/мл	1,65	2,17	2,85	14,43	0,013	11,50	12,22	0,001	0,501
ИЛ 8, пг/мл	10,75	14,40	26,75	28,39	0,013	58,55	155,42	0,005	0,01
ФНОα, пг/мл	2,89	3,12	1,53	3,31	0,116	1,21	3,88	0,278	0,88
ИЛ 4, пг/мл	1,81	0,81	2,70	3,58	0,008	2,04	3,41	0,148	0,34
ИЛ 10, пг/мл	3,64	2,72	8,14	7,92	0,008	3,50	18,93	0,379	0,61
Моча									
ИЛ 1β, пг/мл	3,74	4,46	8,95	20,10	0,040	25,65	41,98	0,001	0,03
ИЛ 6, пг/мл	2,37	1,95	10,55	142,71	0,001	114,97	209,15	0,0004	0,05
ИЛ 8, пг/мл	6,05	3,64	153,80	222,88	0,0001	543,00	236,20	0,0004	0,02
ФНОα, пг/мл	2,33	1,90	3,78	1,69	0,191	3,44	1,96	0,301	0,72
ИЛ 4, пг/мл	1,63	1,99	3,99	3,91	0,022	4,30	11,98	0,003	0,55
ИЛ 10, пг/мл	2,45	5,32	7,65	15,44	0,061	3,80	11,72	0,351	0,50

Примечания:

М – медиана.

SD – среднеквадратичное стандартное отклонение, указывающее на разброс данных по интервалу значения признака относительно медианы.

p-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям контрольной группы.

p *-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям подгруппы с ремиссией ХОП.

Таблица 3

Цитокиновый профиль 2-й группы больных до коррекции ПМП

Показатель	Группа контроля (n=20)		Подгруппа 2А с ремиссией ХОП (n=28)			Подгруппа 2Б с обострением ХОП (n=12)			
			Исходный уровень до операции			Исходный уровень до операции			
	М	SD	М	SD	p-level	М	SD	p-level	p *-level
Кровь									
ИЛ 1β, пг/мл	3,58	3,07	1,64	2,35	0,001	2,74	25,96	0,94	0,005
ИЛ 6, пг/мл	1,65	2,17	4,34	13,21	0,02	3,52	10,38	0,05	0,637
ИЛ 8, пг/мл	10,75	14,40	50,35	47,89	0,0001	40,95	223,97	0,07	0,307
ФНОα, пг/мл	2,89	3,12	3,12	4,22	0,191	1,58	22,32	0,19	0,94
ИЛ 4, пг/мл	1,81	0,81	1,76	2,07	0,07	1,86	1,37	0,08	0,87
ИЛ 10, пг/мл	3,64	2,72	8,55	22,88	0,006	9,13	5,79	0,02	0,813
Моча									
ИЛ 1β, пг/мл	3,74	4,46	2,47	10,75	0,82	11,04	16,75	0,05	0,05
ИЛ 6, пг/мл	2,37	1,95	2,40	5,58	0,65	20,63	250,33	0,005	0,04
ИЛ 8, пг/мл	6,05	3,64	24,25	49,08	0,0003	177,25	274,24	0,004	0,04
ФНОα, пг/мл	2,33	1,90	5,97	9,67	0,01	5,97	9,67	0,02	0,04
ИЛ 4, пг/мл	1,63	1,99	1,89	3,76	0,217	1,89	3,76	0,21	0,24
ИЛ 10, пг/мл	2,45	5,32	5,84	4,79	0,63	3,51	10,32	0,75	0,582

Примечания:

М – медиана.

SD – среднеквадратичное стандартное отклонение, указывающее на разброс данных по интервалу значения признака относительно медианы.

p-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям контрольной группы.

p *-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям подгруппы с ремиссией ХОП.

Цитокиновый профиль 2-й группы больных после коррекции ПМР

Показатель	Группа контроля (n=20)		Подгруппа 2А с ремиссией ХОП (n=28)			Подгруппа 2Б с обострением ХОП (n=12)			
			3-5-е сутки после операции			3-5-е сутки после операции			
	М	SD	М	SD	p-level	М	SD	p-level	p*-level
Кровь									
ИЛ 1β, пг/мл	3,58	3,07	1,64	2,35	0,007	2,74	25,96	0,007	0,005
ИЛ 6, пг/мл	1,65	2,17	4,34	13,21	0,145	3,52	10,38	0,15	0,64
ИЛ 8, пг/мл	10,75	14,40	50,35	47,89	0,0001	40,95	223,97	0,0001	0,31
ФНОα, пг/мл	2,89	3,12	3,12	4,22	0,204	1,58	22,32	0,204	0,94
ИЛ 4, пг/мл	1,81	0,81	1,76	2,07	0,390	1,86	1,37	0,39	0,88
ИЛ 10, пг/мл	3,64	2,72	8,55	22,88	0,098	9,13	5,79	0,09	0,82
Моча									
ИЛ 1β, пг/мл	3,74	4,46	2,48	10,76	0,502	11,04	16,75	0,39	0,14
ИЛ 6, пг/мл	2,37	1,95	2,40	5,59	0,0001	20,63	250,33	0,003	0,003
ИЛ 8, пг/мл	6,05	3,64	24,25	49,09	0,0001	177,25	274,24	0,002	0,01
ФНОα, пг/мл	2,33	1,90	5,97	9,67	0,002	5,97	9,67	0,88	0,04
ИЛ 4, пг/мл	1,63	1,99	1,89	3,76	0,089	1,89	3,76	0,24	0,24
ИЛ 10, пг/мл	2,45	5,32	5,84	4,79	0,794	3,51	10,32	0,94	0,75

Примечания:

М – медиана.

SD – среднее квадратичное стандартное отклонение, указывающее на разброс данных по интервалу значения признака относительно медианы.

p-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям контрольной группы.

p*-level – уровень достоверности (критерий Вилкоксона) различий по отношению к показателям подгруппы с ремиссией ХОП.

Во 2-й группе больных с ПМР в подгруппе 2А (n=28) с ремиссией ХОП до операции отмечалось снижение уровня ИЛ1β, а также сбалансированное увеличение уровня как про- (ИЛ 6,8), так и противовоспалительных цитокинов (ИЛ 10) в сыворотке крови по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 3). В моче у пациентов этой подгруппы обнаружено повышение уровня ИЛ 8 и ФНОα. В подгруппе 2Б (n=12) у пациентов с обострением ХОП до коррекции ПМР было зарегистрировано однонаправленное повышение уровня провоспалительного ИЛ 6 и противовоспалительного ИЛ 10 в сыворотке крови по сравнению с контролем. В моче у пациентов этой подгруппы выявлено значительное повышение уровня всех провоспалительных цитокинов (ИЛ 1β,6,8, ФНОα) (табл. 3). Сравнительный внутригрупповой анализ показал, что достоверным являлось различие в сыворотке в крови только уровня ИЛ1β, который в 2А подгруппе в стадии ремиссии ХОП был несколько снижен, а в 2Б подгруппе в стадии обострения ХОП не отличался от показателей контрольной группы. В моче в подгруппе 2Б имелось более значимое увеличение всех провоспалительных цитокинов (ИЛ 1β,6,8, ФНОα) (табл. 3).

На 3-5-е сутки после эндоскопической коррекции ПМР у больных 2-й группы в обеих подгруппах регистрировалось повышение уровня только провоспалительных цитокинов в сыворотке крови и моче (табл. 4). При сравнении показателей цитокинового профиля в обеих подгруппах установлено, что в подгруппе 2Б с обострением ХОП наблюдались более выраженные сдвиги провоспалительных цитокинов в крови и моче (табл. 4).

Результаты анализов показали высокую диагностическую эффективность выявления воспалительных заболеваний мочевыводящих путей методом исследования цитокинового профиля мочи. Даже при отсутствии изменений стандартных клинико-лабораторных показателей, свидетельствующих о воспалительном процессе в мочевыводящих путях, отмечаются сдвиги чувствительных маркеров воспаления - про- и противовоспалительных цитокинов, подтверждающие хроническое течение обструктивного пиелонефрита у больных с ОУ. Наибольшие изменения цитокинового профиля выявлены в моче, что позволяет оценить тяжесть течения ХОП у больных с ОУ. Важное диагностическое значение имеет провоспалительный цитокин ИЛ 8, который кор-