

ID: 2015-06-1276-A-5294

Оригинальная статья

Захарова Н.Б., Лях Р.В., Вараксин Н.В., Россоловский А.Н., Понукалин А.Н., Попыхова Э.Б.

Перспективы исследования протеомного состава мочи у больных с острым пиелонефритом

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Ключевые слова: острый пиелонефрит

Внедрение современные методов исследования протеома мочи окончательно опровергло длительно существовавшее представление о том, что белки не присутствуют в моче здорового человека. В настоящее время белки, обнаруживаемые в моче человека методами протеомики на основе хромато-масс-спектрометрии и методами иммуноферментного анализа, выделяются из разных мочевыводящих путей [2, 10]. Количественный и качественный составы белков мочи определяют функциональное состояние гломеруллярного барьера и канальцевого аппарата, гемодинамику, концентрацию и качественный состав белков плазмы и системы регуляции их транспорта [13].

Анализ протеома мочи представляет собой быстро развивающуюся аналитическую технологию, которая направлена на создание нового, неинвазивного метода диагностики заболеваний почек и мочевыводящих путей. Моча является идеальной средой для исследования [9, 11]. Сбор мочи у пациента отличается от такой процедуры, как традиционная биопсия почек доступностью, безопасностью, возможностью последовательного отбора проб, возможностью неинвазивного, прогностического и диагностического мониторинга заболевания, контроля эффективности лечения [12]. Установлено, что аналитическая воспроизводимость мочи при определении протеомного профиля мочи не зависит от долгосрочного замораживания, остается стабильной в течение нескольких лет, даже при хранении при -20°C. Воспроизводимость поддерживается в образцах, сохраняемых от 5-6 часов при комнатной температуре или до трех дней при 4°C.

Одним из наиболее часто встречающихся урологических заболеваний почек и мочевыводящих путей во всех возрастных группах, как известно, является пиелонефрит (ПН) [7, 8]. Установлено, что ведущую роль в течении острого ПН и его перехода в хронический воспалительный процесс, часто завершающийся развитием почечной недостаточности, играют нарушения иммунной защиты организма человека [6-8]. Дистрофические и деструктивные процессы в клетках паренхимы почек возникают задолго до клинической манифестации пиелонефрита. Совершенствование методов ранней диагностики и эффективного лечения пиелонефрита и его осложнений связывают с исследованием в моче молекулярных маркеров повреждения почечной паренхимы и мочевыводящих путей: цитокинов, острофазных белков, факторов ангиогенеза и фиброгенеза, играющих важную роль в формировании нефросклероза [14].

В исследование включена группа пациентов (21 человек) в возрасте от 49 до 63 лет с диагнозом «первичный пиелонефрит», проходивших лечение в НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГБОУ ВПО Саратовского ГБУ им. В.И. Разумовского Минздрава России. Оценку активности и тяжести воспалительного процесса у больных проводили по результатам комплексного обследования, включающего изучение жалоб и сбор анамнеза, обзорную рентгенографию почек и мочевых путей, ультразвуковое исследование, пошаговую, спиральную и мультиспиральную компьютерную томографию с реконструкцией изображения, магнитно-резонансную томографию, общий и биохимический анализ крови. Кроме того, в моче пациентов определяли общий белок, лейкоциты и эритроциты. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц.

Для количественного анализа биомаркеров 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). Аликовты мочи разливали в пробирки с крышками типа "Eppendorf" объемом 2 мл и хранили до проведения исследования при температуре -25°C. Концентрацию интерлейкина-8 (IL-1 β), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), моноцитарного хемоаттрактанта (MCP-1) в моче пациентов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), используя соответствующие наборы реагентов ЗАО "Вектор-Бест" (Новосибирск). Исследование биомаркеров у больных пиелонефритом при поступлении в стационар выполняли до начала антибактериальной терапии. Для оценки диагностической чувствительности и специфичности вышеперечисленных биомаркеров применяли ROC-анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета Statistica 6.1. В качестве критерия достоверности различия между двумя независимыми группами использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Во всех процедурах статистического анализа принимали уровень значимости p<0,05.

Результаты исследования представлены в таб.1 и на рис.1.

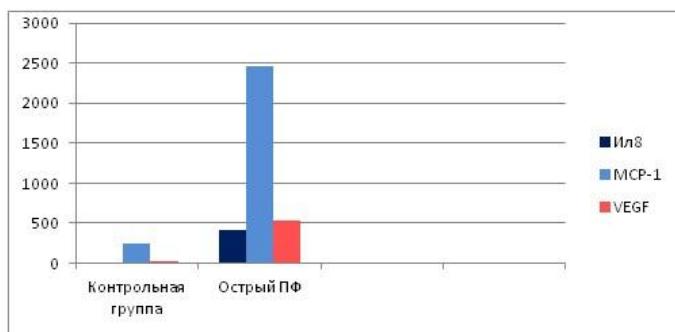


Рис. 1. Кратность превышения концентрации биомаркеров мочи у больных острым пиелонефритом относительно контрольной группы

Таблица 1. Концентрация биомаркеров в моче пациентов с острым пиелонефритом

Определяемый биомаркер	Условно здоровые	Больные острым пиелонефритом
ИЛ-8 пг/мл	0,4; 0,0 – 12,1	414,5*; 93,3-1065,6
MCP-1 пг/мл	253; 159 – 287	2456*; 2118 – 3629
VEGF пг/мл	33; 19 -41	537*; 382 - 658

Таблица 2.Диагностическое значение биомаркеров в моче, рекомендуемые для оценки активности воспалительного процесса и степени ишемического поражения ткани почек при остром пиелонефрите

Показатели	Ил-8	MCP-1	VEGF
Площадь под кривой	0,988	0,998	0,992
Значение cut off	32	316	92
Специфичность	0,95	0,97	0,94
Чувствительность	0,94	0,99	0,99

Для сравнения диагностической значимости определения цитокинов и других исследуемых биомаркеров в моче были использованы образцы этих биологических жидкостей, взятые у 21 больного острым ПН. В остром периоде ПН в моче концентрация всех исследуемых бимаркеров превышала значения контрольной группы в 10-1000 раз. Как видно наиболее значимым был подъем в моче концентрации Ил-8 (в 1000 раз). В меньшей степени нарастала концентрация VEGF и MCP-1. Значимый выброс с мочой медиаторов воспаления и факторов роста свидетельствовал о том, что у больных с острым пиелонефритом одновременно с началом формирования воспалительных процессов на уровне эпителиальной выстилки канальцев почек и интерстициальной ткани формировалась структурно-функциональная перестройка микрососудистого русла почек или его дезадаптивное remodeling с усилением ишемии и запустеванием внутриклубочковых и перитубулярных капилляров.

Тубулоинтерстициальное повреждение почек в остром периоде пиелонефрита можно считать результатом сложных межклеточных взаимодействий, осуществляемых при участии провоспалительных цитокинов и факторов роста. В острой стадии ПН резкое повышение продукции IL-8 в канальцевом эпителии, с одной стороны, приводит к активации воспалительной реакции в интерстиции, а с другой, - способствует формированию гемодинамических и метаболических нарушений на уровне почечных канальцев, эпителиоцитов и мезангiocитов клубочков. В результате развиваются перемежающееся повреждение стенок сосудов, изменение тонуса сосудистого русла и усугубление ишемии почечной паренхимы, которые стимулируют секрецию факторов роста, прежде всего VEGF. В данном процессе активное участие принимает инфильтрат почечного интерстиция, основным компонентом которого являются моноциты/макрофаги; интенсивность их инфильтрации регулируется MCP-1. Информативность каждого из исследуемых биомаркеров определяли по величине площади под характеристической кривой (таб. 2). Выбор точек отсечения (cut off) проводили так, чтобы им соответствовали максимально возможные показатели чувствительности и специфичности анализируемых маркеров в выявлении активности воспалительного процесса в ткани почки.

Как видно концентрации IL-8, MCP-1 и VEGF в моче больных острым ПН, превышающие соответствующие значения cut off, могут применяться в качестве критериев тяжести воспалительного процесса. Высокое содержание биомаркера в моче, по-видимому, может служить предиктором развития артериальной гипертензии и формирования интерстициального фиброза, который, в конечном счете, способен привести к атрофии канальцевого эпителия и развитию почечной недостаточности.

Таким образом, нарастание в моче больных пиелонефритом на высоте обострения воспалительного процесса концентрации Ил-8 может использоваться как показатель поражения эпителия тубулярного аппарата почек; VEGF - для характеристизации степени ишемии почечной паренхимы, а MCP-1 в качестве показателя тяжести тубулоинтерстициального повреждения.

Бактериальные агенты, вызывающие развитие острого ПН, приводят к изменению структурно-функциональных свойств и метаболизма эпителия мочевых путей. Все это сопровождается индукцией провоспалительных цитокинов, приводящей к инфильтрации тканевых структур, окружающих мочевыводящие пути, нейтрофилами и макрофагами, становится причиной дистрофии канальцевого эпителия. В результате у больных ПН развиваются воспалительные изменения паренхимы почек и дезадаптивное remodeling сосудистого русла, которые являются причиной формирования фиброза и развития хронической болезни почек. Исследование таких белков в моче, как IL-8, MCP-1 и VEGF, можно считать неизависимой и безопасной для пациентов технологией диагностики и мониторинга, прогнозирования течения острого пиелонефрита, позволяющей повысить информативность и диагностическую ценность рутинных методов диагностики и снизить процент диагностических ошибок [1,4,5].

Литература

1. Вараксин Н.А., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н. и др. Цитокины и С-реактивный белок при первичном пиелонефрите: сравнение диагностической значимости концентраций в моче и сыворотке крови. Новости «Вектор-Бест» 2012; 2(64): 3–9.
2. Залесский В.Н., Дынник О.Б. Молекулярная медицина: протеомные диагностические технологии и методы молекулярной терапии. Врач Дело 2005; (1–2): 3–10.
3. Земченков А.Ю, Томилина Н.А. "К/ДОКИ" обращается к истокам хронической почечной недостаточности (О новом разделе Рекомендаций K/DOQI по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек). Нефрология и диализ 2004; 6(3): 204–220.
4. Попков В.М., Долгов А.Б., Захарова Н.Б. и др. Мочевые биомаркеры при остром пиелонефрите. Саратовский научно-медицинский журнал 2013; 9(1): 110-115.
5. Морозов Д.А., Морозова О.Л., Захарова Н.Б., Лакомова Д.Ю. Патогенетические основы и современные проблемы диагностики хронического обструктивного пиелонефрита у детей. Урология 2013; (2): 129-134.
6. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Каюков И.Г. Кардио-ренальный континуум: патогенетические основы превентивной нефрологии. Нефрология 2005; 9(3): 7–15.

7. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Каюков И.Г. и др. Рекомендации Научно-исследовательского института нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова: определение, классификация, диагностика и основные направления профилактики хронической болезни почек у взрослых. под ред. А.В. Смирнова. СПб.: Левша, 2008; 51 с.
8. Томилина Н.А., Бикбов Б.Т. Эпидемиология хронической почечной недостаточности и новые подходы к классификации и оценке тяжести хронических прогрессирующих заболеваний почек. Тер Арх 2005; 77(6): 87-921.
9. Achievements in urine of the analysis of a proteome and search of biomarkers. J Am Soc Nephrol 2007; 18: 1057–1071.
10. Boguski M.S., McIntosh M.W. Biomedical informatics for proteomics. Nature 2003; 422: 233–237.
11. Thongboonkerd V. The practical moments in uric proteomic. J Proteome Res 2007; 6: 3881-3890.
12. Thongboonkerd V., Saetun P. Excess bacterial growth influences the analysis of a proteome in the urine: recommendations for centrifugation, temperature, duration and use of preservatives during collecting tests. J Proteome Res 2007; 6: 4173-4181.
13. Thongboonkerd V., Klein J.B., Jevans A.W., McLeish K.R. Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. Contrib Nephrol 2004; 141: 292–307.
14. O'Riordan E., Gross C.C., Goligorsky M.S. Insight Technology: kidney proteomics—at the crossroads between promises and problems. Nat Clin Pract Nephrol 2006; 2: 445–458.
15. Schiepati A., Remuzzi G. Chronic renal disease as a public health problem: Epidemiology, social and economic implications. Kidney Int 2005; 68(Suppl 98): S7-S10.