

Диагностическое значение профиброгенного медиатора TGF-β1 в определении степени тубулоинтерстициального фиброза у больных с пузырно-мочеточниковым рефлюксом

Н. Зайкова

Научно-исследовательский институт охраны здоровья матери и ребенка, Кишинёв

N. Zaicova

Diagnostic Value of Transforming Growth Factor-β1 (TGF - β1) in the Definition of the Degree of Expressiveness in Interstitial Fibrosis in Patients with Vezico-Urethral Reflux

Transforming growth factor-β1 (TGF - β1) - multifunctional cytokine, regulating the normal growth of cells and their differentiation during embryogenesis time, and also plays the leading part in the development of tissue after its damage. In reply to damage of a nephritic fabric TGF - β1, operating as a powerful stimulator proliferation of fibroblast, it stimulates production of extracellular matrix fibers (fibronectine, proteoglicanes), activates production and accumulation of collagens I, III, IV types in the interstitial tissue and in basal to a membrane. **Research objective:** to define the diagnostic importance urine excretion growth - TGF - β1 in patients with VUR in definition of expressiveness degree in interstitial fibrosis. **Material and methods.** The analysis and inspection of 71 patients with vezico-urethral reflux (VUR) at the age from 1 year to 14 years from nephrology and urology departments. There were 51 girls and 20 boys. It was done the full nephrological inspection of all these patients. It was defined the level TGF - β1 and the creatinine level by immunoenzyme analysis method (ELISA set) in the morning urine. The level TGF - β1 was counted on ng/mmol Cr. In dependence of VUR degree all the patients were divided conditionally into 2 groups: 1 - VUR I-II degrees (35 children) and 2 - VUR III-IV-V degrees (36 children). The control group consisted only of healthy children (10 children), without a nephritic pathology in the anamnesis. **Results.** The analysis of the received results has revealed the production of the substantial increase TGF - β1 in urine in all the patients with VUR in comparison with control group (107.51±24.35). The TGF - β1/Cr level in urine at a high degree of reflux-nephropatii is significantly above in comparison with I-II degrees that confirm communication of profibrogen factor TGF - β1 with expressiveness of sclerosis processes in tubulointerstitial fabrics. **Conclusion.** Thus, studying mechanisms of damage of nephritic cells and the search of early and accessible biomarkers interstitial fibrosis can be used as criterion of progression a reflux-nephropaty at VUR and renal tissue damage.

Key words: TGF-β1, VUR, reflux-nephropathy

Реферат

Профиброгенный медиатор TGF-β1 – мультифункциональный цитокин, регулирующий нормальный рост клеток и их дифференциацию во время эмбриогенеза, а также играет ведущую роль в развитии фиброза ткани после ее повреждения. В ответ на повреждение почечной ткани TGF-β1, действуя как мощный фактор пролиферации фибробластов, стимулирует продукцию экстрацеллюлярных матричных белков (фибронектина, протеингликанов), активирует продукцию и накопление в интерстиции и в базальной мембране коллагенов I, III, IV типов. **Цель исследования:** определить диагностическую значимость мочевой экскреции профиброгенного медиатора TGF-β1 у больных с пузырно-мочеточниковым рефлюксом (ПМР) в определении степени выраженности тубулоинтерстициального фиброза. **Материал и методы.** Обследован 71 ребенок с ПМР в возрасте от 1 года до 14 лет, из них 51 девочка и 20 мальчиков. Всем больным было проведено полное нефроурологическое обследование. В утренней моче определяли уровень TGF-β1 методом иммуноферментного анализа (ELISA) и уровень креатинина. Уровень TGF-β1 рассчитывали на ммоль креатинина (нг/ммоль креатинина). В зависимости от степени ПМР пациенты были разделены условно на 2 группы: 1 группа – ПМР I-II степени (35 детей) и 2 группа - ПМР III-IV-V степени (36 детей). Контрольную группу составили здоровые дети (10 детей), без почечной патологии в анамнезе. **Результаты.** Анализ полученных результатов выявил значительное повышение продукции TGF-β1 в моче у всех больных с ПМР по сравнению с группой контроля (107,51 ± 24,35). Уровень TGF-β1/Cr в моче при высокой степени рефлюкс-нефропатии достоверно выше по сравнению с I-II степенью, что подтверждает связь профиброгенного медиатора TGF-β1 с выраженностью склеротических процессов в тубулоинтерстициальной ткани. **Заключение.** Таким образом, изучение механизмов повреждения почечных клеток и поиск ранних и доступных биомаркеров тубулоинтерстициального фиброза, может быть использовано в качестве критерия прогрессирования рефлюкс-нефропатии при ПМР.

Ключевые слова: TGF-β1, ПМР, рефлюкс-нефропатия.

Актуальность

За последние несколько лет при наличии множества обзоров литературы, посвященных, пузырно-мочеточниковому рефлюксу (ПМР), вопрос ранней диагностики прогрессирования нефропатии при ПМР остается чрезвычайно важным в современной нефрологии.

Актуальность исследований в этой области связана с нередким развитием хронической почечной недостаточности, в результате развития рубцово-склеротического процесса в паренхиме почки, описываемого как рефлюкс-

нефропатия [1, 3, 18]. Нарушение уродинамики при ПМР приводит к сдавливанию околоканальцевых капилляров и их ишемии, увеличению почечной фильтрации и усиленному проникновению плазменных белков в интерстиций, снижение эффективного почечного кровотока, что приводит к повреждению почечных канальцев и выработке биологически активных соединений (профиброзирующих цитокинов) с последующим изменением структурно-функционального состояния почек [4, 5].

TGF-β1 – мультифункциональный цитокин, регулирующий нормальный рост клеток и их дифференциацию

во время эмбриогенеза, а также играет ведущую роль в развитии фиброза ткани после ее повреждения [5,7], источником которого являются макрофаги, тромбоциты, фибробласты, активированные Т-лимфоциты, клетки эндотелия сосудов и канальцев. В ответ на повреждение почечной ткани TGF- β 1, действуя как мощный стимулятор пролиферации фибробластов, стимулирует продукцию экстрацеллюлярных матричных белков (фибронектина, протеингликанов), активирует продукцию и накопление в интерстиции и в базальной мембране коллагенов I, III, IV типов [2, 8, 9, 13].

Следует отметить, что наряду с теоретическими аспектами гиперпродукции профиброзирующих цитокинов в почках при ПМР, большое значение имеет и практическая сторона этого вопроса, поскольку своевременную диагностику развития тубулоинтерстициального фиброза нельзя считать удовлетворительной. В литературе имеются лишь единичные и краткие сообщения на этот счет [4, 10, 15, 17]. В связи с этим, большое значение может играть разработка и внедрение в комплексном обследовании больных с ПМР определение факторов, позволяющих вскрыть изменения субмикроскопической организации клеток в почках при развитии склеротических изменений в динамике. Учитывая, что TGF- β 1 непосредственно участвует в процессе фиброгенеза, мы исследовали активность данного цитокина в моче у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом и пиелонефритом в клинико-лабораторной ремиссии.

Цель исследования: установить диагностическую значимость мочевой экскреции профиброгенного медиатора - TGF- β 1 в определении степени выраженности тубулоинтерстициального фиброза у больных с ПМР.

Материал и методы

В отделениях нефрологии и урологии НИИОЗМиР (2008-2009) обследован 71 ребенок с ПМР, в возрасте от 1 года до 14 лет, из них 51 девочка и 20 мальчиков. Всем больным было проведено полное нефроурологическое обследование (ультразвуковое исследование, УЗИ - доплер, микционная цистография, экскреторная урография, статическая (ДМСА-сцинтиграфия) и динамическая нефросцинтиграфия, анализы крови и мочи, уровень мочевины и креатинина в крови, определение скорости клубочковой фильтрации, концентрационная функция почек в пробе Зимницкого, бактериологическое исследование мочи, разовое измерение артериального давления).

В утренней моче определяли уровень TGF- β 1 методом иммуноферментного анализа (ELISA) и уровень креатинина. Уровень TGF- β 1 рассчитывали на ммоль креатинина (нг/ммоль креатинина).

В зависимости от степени ПМР пациенты были разделены условно на 2 группы: 1 – ПМР I-II степени (35 детей) и 2 группа - ПМР III-IV-V степени (36 детей). Контрольную группу составили здоровые дети (10 детей), без почечной патологии в анамнезе.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Statistica for

Windows 6.0. Достоверными считались различия показателей при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Большинство из обследованных больных имели односторонний ПМР в 60,6% случаев, двусторонний (39,4% случаев). Временной промежуток от момента выявления ПМР до включения в исследование составил от 2 до 24 месяцев. Длительность ремиссии мочевой инфекции на момент включения в исследование составляла 45,1% до 3 месяцев и более 3 месяцев в 54,9%. Выявлено преобладание девочек с ПМР и явная возрастная доминанта детей младшего возраста (таб. 1).

Таблица 1

Возрастной состав больных в зависимости от пола

Возраст, годы	Девочки		Мальчики		Всего	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
От 1 года до 3 лет	21	41,2*	7	35	28	39,4*
От 4-8 лет	14	27,4	9	45	23	32,4*
От 9-14 лет	16	31,4	4	20	20	28,2
Всего	51	71,8	20	28,2	71	100

Примечание :* достоверность между подгруппами $p < 0,05$

Установлена тенденция к снижению частоты ПМР у детей старше 5 лет, что, по-видимому, обусловлено возрастными особенностями строения пузырно-мочеточникового соустья данной возрастной группы и становлением взрослого типа мочеиспускания. Клинические симптомы значительно варьировали по характеру и степени выраженности в различных возрастных группах. Так, длительный субфебрилитет встречался чаще у детей 1 года жизни в 30,1% случаев. Дизурические явления и энурез в 33,8% случаев были установлены в старшей возрастной группе. При разовых измерениях АД по методу Короткова повышение отмечалось только в 9,8% случаев. По нашим данным только у 1/3 больных наблюдалась пиелозктазия по данным УЗИ. Большинство обследованных больных имели положительный результат урокультуры (в 59,1% случаев), причем в 58,8% случаев высевалась *E. coli*, *Klebsiella* - в 23,2%, *Proteus* - в 4,6%, *Enterococcus* - в 13,4% случаев. У 40,9% моча была стерильной, что согласуется с данными литературы [6]. Нарушение азотемической функции почек было установлено только у одной девочки.

Анализ полученных результатов выявил значительное повышение продукции цитокина у всех больных с ПМР (216,95 \pm 24,16) по сравнению с группой контроля (107,51 \pm 24,35). С нашей точки зрения, это может быть результатом привлечения макрофагов и лимфоцитов в почечных интерстициях и, по-видимому, свидетельствует об активности воспалительного процесса, несмотря на видимое клиническое благополучие больных с ПМР.

В таблице 2 отображен уровень TGF- β 1 в моче в зависимости от степени ПМР и возраста больных. Наименее высокий уровень данного цитокина встречался у

детей младшей возрастной группы и при низких степенях ПМР ($p < 0,05$). Однонаправленные изменения уровня TGF- β 1 в моче у этих пациентов связаны, скорее всего, с гиперпродукцией трансформирующего фактора роста- β 1 в интерстиций почечной ткани и его патофизиологическая роль в прогрессировании почечных болезней, в том числе образования почечных рубцов (таб. 2).

Таблица 2

Уровень TGF- β 1 в моче (нг/ммоль креатинина) в зависимости от степени ПМР и возраста детей

Возраст	Абс	1 (I-II) (n = 35)	Абс	2 (III-IV) (n = 36)
До 3 лет	13	401,2 \pm 41,9*	14	218,9 \pm 32,1
4-8 лет	10	218,4 \pm 44,64*	14	151,1 \pm 39,06
9-14 лет	12	231,6 \pm 31,48	8	206,2 \pm 36,4

Примечание :* достоверность между подгруппами $p < 0,05$

На рис. 1 отображен уровень частоты встречаемости TGF- β 1 в зависимости от степени ПМР.

Проведенные нами исследования показали зависимость продукции цитокина от выраженности тубулоинтерстициального фиброза почечной ткани у детей с различной степенью ПМР. Установлено повышенное содержание уровня TGF- β 1 в моче у детей с низкими степенями ПМР, что, по-видимому, свидетельствует о выраженной инфильтрации почечного интерстиция фибробластами и об активности неофиброгенеза по сравнению с пациентами с высокими степенями ПМР. В группе, с высокими степенями ПМР, по-видимому, преобладают деструктивные процессы в интерстиции почки и апоптоз. Наши данные согласуются и с литературными данными [4, 5, 8]. Следует отметить, что достоверных различий частоты TGF- β 1 в моче у больных, как при одностороннем, так и при двустороннем ПМР, нами отмечено не было.

Особого внимания заслуживают больные, у которых при статистической нефросцинтиграфии с ДМСА обнаруживались очаги низкой плотности накопления димеркаптуриновой кислоты, что свидетельствовало о снижении объема функционирующей паренхимы. общепринятым диагностическим критерием рефлюкс-нефропатии являются стойкие нефросцинтиграфические дефекты, что легло в основу классификации патологии по типу почечных рубцов [Goldraich, 1984]: А – 1-2 рубца, В – 2-3 рубца с сохранной почечной паренхимой, С – очагово-диффузное распространение склеротических очагов с сохраненным почечным контуром, D – «маленькая» или атрофированная почка [15]. Среди 71-го больного, 34 пациента имели тип А рубцов и 20 пациентов - тип В, 17 детей с высокими степенями ПМР и часторецидивирующим течением пиелонефрита имели С и D тип рубцов (тип С = 14 и тип D = 3 пациента). Мы объединили А и В в I-II степень (легкая) и, С и D в III – IV степень (тяжелая) рефлюкс-нефропатии.

Установлено, что уровень TGF- β 1/Cr в моче при высокой степени рефлюкс-нефропатии (278,1 \pm 76,11) был

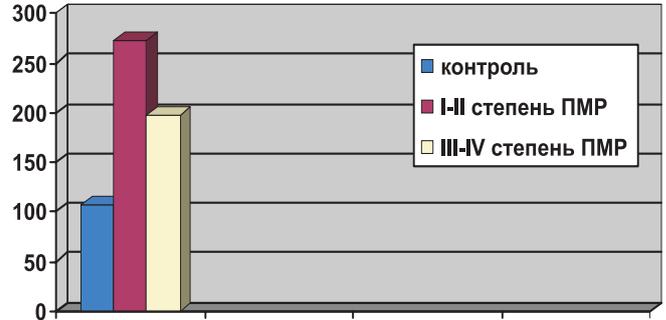


Рис. 1. Уровень TGF- β 1 в моче (нг/ммоль креатинина) в зависимости от выраженности ПМР.

достоверно выше по сравнению с I-II степенью рефлюкс-нефропатии (112,6 \pm 42,67) $p < 0,05$, что подтверждает связь профиброгенного медиатора TGF- β 1 с выраженностью склеротических процессов в тубулоинтерстициальной ткани. Повышенный уровень экскреции TGF- β 1/Cr с мочой определялся почти у 2/3 детей (60%) с выраженной рефлюкс-нефропатией и незначительный уровень при ее низких степенях. Значимое повышение уровня TGF- β 1 в моче у детей с высокой степенью рефлюкс-нефропатии, по мнению ряда авторов, свидетельствует о прогрессировании нефросклеротических изменений в почечной интерстиции и, по-видимому, играет переломную роль в качестве неблагоприятного прогностического фактора в развитии почечной недостаточности [7, 17, 19].

О глубине склеротических процессов и степени тубулоинтерстициального фиброза свидетельствовали также выраженные изменения ультразвуковых параметров интрааренального кровотока с помощью Допплер: максимальной и минимальной скорости и резистивных характеристик. Отчетливое снижение накопления димеркаптуриновой кислоты при ДМСА-сцинтиграфии в участках почечной паренхимы по локализации совпадали с зонами гиперэхогенности и обеднения кровотока. Так, у пациентов с высокой степенью рефлюкс-нефропатии отмечалось достоверное снижение скоростных характеристик и индекса резистентности и повышение активности TGF- β 1 в моче по сравнению с группой контроля и низкими степенями рефлюкс-нефропатии. В тоже время, у 47,8% больных с ПМР и низкой степенью рефлюкс-нефропатии, резистивные характеристики сохранялись в пределах возрастной нормы. Выявленные изменения обусловлены развитием у данных пациентов компенсированного артериовенозного шунтирования на юкстамедулярном уровне для снижения периферического сопротивления интрааренальных сосудов при инфильтративных процессах, что согласуется и с результатами экспериментальных исследований С.С. Пауновой и соавт. (2005).

Таким образом, у всех больных с ПМР нами установлены однонаправленные изменения продукции TGF- β 1 в моче, что может быть использовано для выделения групп высокого риска по развитию тубулоинтерстициального фиброза до развития явной клинической картины (протеинурия, артериальная гипертензия).

Заклучение

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что тубулоинтерстициальный фиброз – это патологический процесс, приводящий к почечной недостаточности. TGF- β 1 в норме является важным регулятором клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, иммунного ответа, ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса [7, 11]. Повышенная продукция TGF- β 1, по-видимому, способствует дисбалансу между чрезмерным накоплением внеклеточного матрикса и недостаточной его деградацией. В результате, может формироваться тубулоинтерстициальный фиброз с атрофией канальцевого аппарата почек с уменьшением количества функционирующих перитубулярных капилляров. В конечном итоге, нарушение кровообращения приводит к еще большей продукции TGF- β 1 и усугублению тубулоинтерстициального фиброза. Полученные нами результаты согласуются и с другими фундаментальными работами [9, 17, 18]. Так, Н. J. Anders и соавт. (2003) установили, что любое повреждение (обструкция, инфекция) клеток почечной паренхимы, приводит к гиперпродукции ими медиаторов воспаления (провоспалительных цитокинов и факторов роста), которые обеспечивают приток лейкоцитов и моноцитов в область повреждения и формируют воспалительный инфильтрат [8, 21]. Повторные введения TGF- β 1 лабораторным животным в течение 2 недель, способствуют развитию тубулоинтерстициального фиброза ткани почек в местах инъекций [20]. Исследованиями Н. Kaneto и соавт. (1999) показано, что обструкция пельвиоуретерального сегмента сопровождается повышением TGF- β 1 в моче и избыточным накоплением коллагена I и IV типов в интерстиции почки [17]. U. Junker и соавт. (2000) сообщают, что у больных с гидронефрозом и пиелонефритом, TGF- β 1 повышается не только в моче, но и в плазме крови, что возможно свидетельствует о дистантном действии этого цитокина [16]. Значительное повышение продукции TGF- β 1 в моче 360 больных с ПМР по сравнению с детьми без нарушений уродинамики, а также зависимость его продукции от степени тубулоинтерстициального фиброза, отметили С. С. Паунова и соавт. [5]. Высокий уровень TGF- β 1 в моче у 16 больных с инфекцией мочевых путей и его потенциальную роль в развитии фиброгенеза, определили E. Farmaki и соавт. [14].

Следовательно, значительное повышение продукции TGF- β 1 в моче у всех больных с ПМР, по-видимому, определяет зависимость его активности от выраженности структурно-функциональных изменений в почках.

Таким образом, длительная гиперпродукция TGF- β 1, приводит к развитию профибротических эффектов, что ставит под угрозу нормальное функционирование органа [12, 13]. Учитывая тот факт, что почка не обладает способностью к регенерации, изучение механизмов повреждения клеток и поиск ранних и доступных биомаркеров тубулоинтерстициального фиброза, может быть использовано в качестве чувствительного критерия прогрессирования рефлюкс-нефропатии при ПМР.

Литература

1. Аничкова ИВ. Особенности течения пузырно-мочеточникового рефлюкса и рефлюкс-нефропатии в детском возрасте: Диссер. канд. мед.наук. С-Петербург, 1997;40.
2. Вялкова АА, Мирошниченко АГ, Зорин ИВ. Системная гипертензия, ранняя диагностика и прогнозирование прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей. *Нефрология и диализ*. 2007;9(3):351-352.
3. Летифов ГМ. Патогенетические механизмы возникновения и хронизации пиелонефрита у детей. *Нефрология и диализ*. 2001;3(4):475-477.
4. Махачев БМ. Рефлюкс-нефропатия у детей. *Российский вестн. перинатологии и педиатрии*. 2004;6:26-28.
5. Паунова СС, Кучеренко АГ, Смирнов ИЕ. Системы цитокинов и гуморальных факторов роста при ПМР у детей. *Нефрология и диализ*. 2005;7(4):435-439.
6. Серова ГА, Паунова СС. Инфекция мочевой системы у детей. *Нефрология и диализ*. 2007;9(1):86-91.
7. Чеботарева НВ, Бобкова ИН, Козловская ЛВ. Молекулярные механизмы интерстициального фиброза при прогрессирующих заболеваниях почек. *Нефрология и диализ*. 2006;8(1):26-35.
8. Andrs HJ, Vielbaner V, Schblondorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*. 2003;63:401-415.
9. Barius WH, Cortez SL, Deboiblanс M, et al. Transforming Growth Factor-b1 a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:790-795.
10. Beckes GJ, Hewitson TD. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Nephrology and Hypertension*. 2000;9(2):133-138.
11. Bobtinger EP, Bitzer M. TGF- β 1 signaling in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2002;13:2600-2610.
12. Chevalier RL, Klahr S. Therapeutic approaches in obstructive uropathy. *Semin Nephrol*. 1998;18(6):652-658.
13. Chevalier RL. Effects of ureteral obstruction on renal growth. *Semin Nephrol*. 1995;15(4):353-360.
14. Farmaki E, Winn RM, Parachristou F, et al. Transforming Growth Factor-b1 (TGF) in Urine of Infants and Young Children with Urinary Tract Infection (UTI). *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother*. 2002;27-30;42:abstract no.G-1463.
15. Goldraich NU, Smailie GM, Chaw PJ, et al. Childhood reflux and urinary reflexion: a fall to follow of 10-41 E 226 adalp. *Paediatric Nephrology*. 1998;12:727-736.
16. Junker U, Haufe CC, Nuske K, et al. Elevated plasma TGF-beta1 in renal diseases: cause or consequence? *Cytokine*. 2000;12(7):1084-1091.
17. Kaneto H, Ohtani H, Fukuzaki A, et al. Increased expression of TGF-beta1 but not of its receptors contributes to human obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 1999;56(6):2137-2146.
18. Ong AC, Fine LC. Tubular derived growth factors and cytokines in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis: Implication for human renal disease progression. *Am J Kidney*. 1994;23:205-209.
19. Sweeney B, Cascio S, Velayudham M, et al. Reflux nephropathy in infancy: a comparison of infants presenting with and without urinary tract infection. *J. Urol*. 2001;166(2):648-650.
20. Tevull TG, Working PK, Cbow CP, et al. Pathology of recombinant human Transforming Growth Factor-b1 in rats and rabbits. *Int. Rew. Exp. Pathol*. 1993;51:3590-3594.
21. Yamamalo T, Noble NA, Milles DE, et al. Sustained expression of TGF- β 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int*. 1994;45:916-927.

Corresponding author

Zaicova, Natalia, M. D., Ph. D., Nephrologists
 Institute for Research of Mother and Child Care
 Department of Nephrology
 93, Burebista Street, Chisinau
 Republic of Moldova
 Tel.: 373 22 523558

Manuscript received September 14, 2010; revised manuscript December 03, 2010