

Литература

1. Баранов А. А., Ильин А. Г. Актуальные проблемы сохранения и укрепления здоровья детей в Российской Федерации // Российский педиатрический журнал – 2011. – № 4. – С. 7–12.
2. Веремчук Л. В., Горборукова Т. В., Кику П. Ф. Информационно-аналитическое моделирование медико-экологических процессов здоровья населения // Информатика и системы управления – 2007. – № 1. – С. 8–11.
3. Ермакова Н. В. Эколого-физиологические особенности адаптивных реакций организма жителей различных климато-географических регионов // Эколого-физиологические проблемы адаптации: матер. X международного симпозиума. – М.: Изд-во РУДН, 2001. – С. 186–188.
4. Кучма В. Р., Сухарева Л. М., Баранов А. А. Состояние здоровья современных детей и подростков и роль медико-социальных факторов в его // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2009. – № 5. – С. 6–11.
5. Лощенко М. А., Учакина Р. В., Козлов В. К. Репродуктивное здоровье подростков с хронической почечной патологией // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 81–83.
6. Учакина Р. В., Лощенко М. А., Козлов В. К. Физическое развитие подростков с хронической почечной патологией // Дальневосточный медицинский журнал – 2011. – № 2. – С. 38–40.
7. Учакина Р. В., Лощенко М. А., Козлов В. К. Особенности полового развития и гормональный статус подростков с хронической почечной патологией // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 47–49.
8. Участковый педиатр: справочное руководство / под. ред. М. Ф. Рзянкиной, В. П. Молочного. – 3-е изд. – Ростов-н/Д: Феникс, 2006. – 313 с.: ил. – (Медицина для вас).
9. Jennes L. J. & Conn P. M. Gonadotropin-releasing hormone // Hormones, brain and behavior (eds. D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. M. Etgen et al.). New York: Academic Press, 2002. – P. 51–79.
10. Styne D. M. The regulation of pubertal growth // Hormone research. 2003. – Vol. 60, Suppl 1. – P. 22–26.

Координаты для связи с авторами: Лощенко Мария Александровна – аспирант, младший научный сотрудник НИИ охраны материнства и детства, тел. +7-909-871-98-92, e-mail: m.lo85@mail.ru; Учакина Раиса Владимировна – д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник НИИ охраны материнства и детства, тел. 8-(4212)-980-591, e-mail: iomid@yandex.ru; Евсеева Галина Петровна – д-р мед. наук, ученый секретарь, ведущий научный сотрудник НИИ охраны материнства и детства, e-mail: iomid@yandex.ru; Козлов Владимир Кириллович – д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки, член-корр. РАМН, директор НИИ охраны материнства и детства, e-mail: iomid@yandex.ru.



УДК: 612.017.11:616.61-002.3:616-053.37

Е. П. Батаева

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-4 (C589T) И TNFA (G308A) НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ ПРИ ПИЕЛОНЕФРИТАХ

Читинская государственная медицинская академия,
672090, ул. Горького, 39а, тел. 8-(3022)-32-00-85, e-mail: pochta@medakadem.chita.ru, г. Чита

Резюме

Обследовано 36 детей с обструктивными и необструктивными пиелонефритами, у которых изучены полиморфизмы генов IL-4 (C589T) и TNFA (G308A), а также выявлены содержание IL-4, TNFA, IL-8, IL-1β, IFN-γ в период разгара и ремиссии заболевания у носителей полиморфных аллелей в сравнении с детьми, не имеющими изучаемых мутаций. Выявлено, что у здоровых детей, проживающих в Забайкалье, вариант СТ гена IL-4 выявляется чаще, чем вариант GA гена TNFA. У детей при пиелонефритах мутация гена IL-4 (C589T) встречается чаще, чем у здоровых детей. Присутствие варианта C589T гена IL-4 у больных сопровождается более низкими значениями IL-8 в период разгара. Выявлены высокие показатели IFN-γ у носителей полиморфизма G308A гена TNFA в период ремиссии.

Ключевые слова: пиелонефрит у детей, полиморфизм генов, генотип, цитокины, клинический индекс, нефро-склероз.

INFLUENCE POLYMORPHISM OF GENES IL-4 (C589T) AND TNFA (G308A) ON CONTENT OF CYTOKINE IN CHILDREN WITH PYELONEPHRITIS

Chita State Medical Academy, Chita

Summary

Was to study 36 children with obstructive and nonobstructive pyelonephritis, at which polymorphisms of genes of IL-4 (C589T) and TNFA (G308A), and also were revealed the maintenance of IL-4, TNFA, IL-8, IL-1 β , IFN- γ in the period of a heat and disease remission at carriers polymorphic allely in comparison with children, not having studied mutations. Was to reveal that in the healthy children living in Zabaikalie, the variant of ST of a gene of IL-4 comes to light more often than GA option of a gene of TNFA. In children at pyelonephritises the mutation of a gene of IL-4 (C589T) meets more often than in healthy children. Presence of C589T option of a gene of IL-4 in patients is accompanied by lower IL-8 values in the period of a heat. High rates of IFN- γ at carriers of polymorphism of G308A of a gene of TNFA during remission are revealed.

Key words: pyelonephritis in children, polymorphism of genes, a genotype, cytokins, a clinical index, nephrosclerosis.

В современной педиатрической нефрологии рассматриваются представления о прогрессировании нефропатий, и зачастую их неблагоприятное течение связано с едиными механизмами, посредством которых на клеточном и биохимическом уровне реализуется патологический эффект различных генных мутаций [6, 7]. Это является необходимым условием для выбора оптимальной стратегии идентификации соответствующих генных дефектов, понимания особенностей иммунопатогенеза и проявлений заболеваний [5]. Многообразие ранее известных маркеров, индуцирующих развитие склероза – фактор роста фибробластов, инсулиноподобный фактор роста-1, ангиотензин-II, IL-1, IL-6, IL-8, индуцибельная макрофагальная изоформа NO-синтазы (iNOS) и др. в настоящее время не исчерпывают решение проблемы развития нефросклероза у детей [10, 12].

Гены цитокинов имеют аллельные варианты, характеризующиеся большей или меньшей активностью белка, либо разным уровнем его экспрессии. Одним из приоритетных направлений изучения наследственной компоненты заболеваний является подход с использованием генов-кандидатов, для которых установлена роль их белковых продуктов в патогенезе изучаемого заболевания [1].

Существуют исследования, посвященные изучению полиморфизмов различных сигнальных молекул при хронических заболеваниях легких, печени, привычных невынашиваниях беременности, нефротическом синдроме, люпус-нефритах и др. [4, 11]. Значение данных работ велико и при бактериальных поражениях почек, так как у части детей склерозирование и фиброз почечной ткани при пиелонефрите (ПН) происходит прогрессивно, несмотря своевременную ликвидацию воспалительного процесса и возможных уродинамических нарушений [2, 3, 10].

Целью исследования явилось выявление влияния аллельных вариантов IL-4 (C589T) и TNF (G308A) на уровень цитокинов у детей при пиелонефритах.

Материалы и методы

В исследование включено 36 детей с обструктивными и необструктивными пиелонефритами в возрасте от 3 до 12 лет (29 девочек и 7 мальчиков).

Исследуемым материалом для анализа явилась цельная венозная кровь и буккальный эпителий. При определении концентрации цитокинов в сыворотке

крови использовались наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) с помощью метода твердофазного ИФА. Выделение ДНК осуществлялось при помощи наборов «ДНК-экспресс кровь» (НПФ «Литех», Россия, Москва). Детекция продуктов амплификации осуществлялась электрофоретическим способом. Контрольную группу составили 100 здоровых детей соответствующих по возрасту и полу клинической группе.

Статистическая обработка полученных данных осуществляется при помощи электронной программы (Microsoft Office 2003 for Windows XP Professional, STATISTICA 6.0 (Stat. Soft. Inc. США)) с определением достоверности различий при значении $p < 0,05$. Для сравнения частот при нормальном распределении признака применялся критерий Стьюдента. Для оценки непараметрических не связанных между собой показателей использовали критерий Манна-Уитни, связанных – критерий Вилкоксона. Соответствие наблюдаемых распределений частот генотипов, теоретически ожидаемым по уравнению Харди-Вайнберга, оценивали с использованием критерия χ^2 . Для оценки ассоциаций рассчитывали относительный риск (OR).

Результаты и их обсуждение

Молекулярно-генетические исследования показали, что среди обследованных здоровых детей, проживающих в Забайкалье, гетерозиготное (С/Т) носительство IL-4 (C589T) выявлено у 30,3 %, гомозиготное (Т/Т) – у 6 % детей (табл. 1). Частота встречаемости полиморфизма TNFA (G308A) среди здоровых детей составила 20 % – все они явились носителями гетерозиготного варианта (табл. 2). Половых и возрастных различий в распределении частот и генотипов не отмечено.

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера C589T гена IL-4 у больных с пиелонефритами в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Контроль (n=66)	Больные ПН (n=36)	P	OR
Аллель С	0,79	0,68	$>0,05$	0,28
Аллель Т	0,21	0,32	$<0,05$	2,15
Генотип С/С	0,64	0,44	$>0,05$	0,26
Генотип С/Т	0,30	0,53	$<0,05$	2,54
Генотип Т/Т	0,06	0,03	$>0,05$	0,2
Сочетанная мутация генов IL-4 (С/Т) и TNFA (G/A)	0,06	0,05	$>0,05$	0,2

Примечание. p – значимость различий по отношению к группе контроля.

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера G308A гена TNF α у больных с пиелонефритами в сравнении с контрольной группой

Генетический маркер	Контрольная группа (n=70)	Больные ПН (n=36)	P	OR
Аллель G	0,9	0,12	>0,05	0,77
Аллель A	0,1	0,87	<0,05	1,28
Генотип G/G	0,8	0,8	>0,05	0,9
Генотип G/A	0,2	0,14	>0,05	0,64
Генотип A/A	0	0,06	<0,05	10,2

Примечание. p – значимость различий по отношению к группе контроля.

Обнаружено, что более половины больных, страдающих пиелонефритами, явились носителями варианта C/T полиморфного участка C589T гена IL-4, так 19 из 36 детей (52,7%) оказались гетерозиготами по данному аллелю, в одном случае встретился гомозиготный вариант (2,7%). Расчет отношения шансов (OR) выявил положительную ассоциацию аллеля T и генотипа C/T с ПН, что указывает на повышенный риск его развития у детей, имеющих данную мутацию (табл. 1). Основной процент носителей аллельных вариантов C589T гена IL-4 (65% – 13 человек из 20) выявлен при необструктивных ПН, при пиелонефритах с нарушенной гидродинамикой мочи – процент встречаемости полиморфных генов оказался значительно ниже, что, вероятно, в данном случае указывает на преобладающее влияние различных тератогенных факторов на возникновение патологии (35%).

У 5 больных (13,9%) отмечалось гетерозиготное, а у 2 детей (5,55%) – гомозиготное носительство полиморфизма G308A гена TNF α . Среди гетерозигот 2 ребенка имели сочетанный полиморфизм генов IL-4 (T 589) и TNF α (G308A). Маркером нефросклероза выступил генотип A/A гена TNF α (табл. 2). Это дает

основание предполагать манифестацию заболевания у больных с нарушением уродинамики за счет экспрессии генов, кодирующих повышенную продукцию факторов роста с последующей мононуклеарной инфильтрацией интерстиция и повреждением клеток почек под влиянием цитокинов [8].

Только 11 пациентов (30,5%), страдающих микробно-воспалительными заболеваниями почек, не имели диагностированных мутаций.

При пиелонефритах у детей содержание IL-8 повышалось до $35 \pm 3,0$ пкг/мл в период активных проявлений и до $22,9 \pm 1,3$ пкг/мл в период ремиссии в отличие от $8 \pm 0,5$ пкг/мл группы контроля ($p < 0,001$). Концентрация его при необструктивных ПН при поступлении оказалась выше – $50,5 \pm 4,8$ пкг/мл, чем при обструктивных – $29,0 \pm 3,4$ пкг/мл (табл. 3). Длительное повышенное содержания провоспалительных цитокинов в крови у пациентов на фоне пузырно-мочеточникового рефлюкса – результат медленного «рассасывания» инфильтрата в условиях отрицательной гидродинамики и повышенного внутрилоханочного давления [11, 12].

Присутствие аллельного варианта C589T гена IL-4 у больных сопровождалось более низкими значениями концентрации IL-8 в начале заболевания. Являясь непосредственным участником воспалительных процессов, IL-8 активирует тканевый фактор, тем самым, провоцирует миграцию нейтрофилов, базофилов, макрофагов, эндотелиальных клеток в очаг воспаления, локального их накопления, повреждения, ишемии и т.п. Возможно, уменьшение активности синтеза интерлейкина у данных пациентов выступает в качестве защитно-ограничительного механизма, препятствующего в последующем замещению интерстициальной ткани и паренхимы почки соединительной тканью.

Таблица 3

Содержание цитокинов у детей при ПН, отягощённых и неотягощённых мутациями C589T (IL-4) и G308A (TNF α) (M $\pm$ SD)

Показатель (пкг/мл)	Контроль (n=30)	Группа больных ПН (n=36)		Больные ПН, не имеющие мутаций (n=11)		Мутация в гене IL4 (n=20)		Мутация в гене TNF α (n=7)	
		в начале лечения	в конце лечения	в начале лечения	в конце лечения	в начале лечения	в конце лечения	в начале лечения	в конце лечения
IL-4	$34,3 \pm 2,8$	$62,6 \pm$	$44,0 \pm$	$67,4 \pm 4,9$ $p_1 < 0,001$	$50,1 \pm 5,1$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$62,5 \pm 2,9$ $p_1 < 0,001$	$40,3 \pm 2,6$ $p_3 < 0,001$	$51,8 \pm 9,4$ $p_1 < 0,05$	$40,3 \pm 3,9$ $p_1 < 0,001$
IL-8	$8 \pm 0,5$	$35 \pm$	$22,9 \pm$	$48,8 \pm 6,2$ $p_1 < 0,001$	$21,3 \pm 2,2$ $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	$30,4 \pm 3,3$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	$23,5 \pm 2,3$ $p_1 < 0,001$	$49,9 \pm 9,7$ $p_1 < 0,001$	$24 \pm 1,9$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
IFN γ	$22,7 \pm 2,0$	$58,5 \pm$	$33,9 \pm$	$59,9 \pm 10,2$ $p_1 < 0,001$	$31,3 \pm 4,7$ $p_3 < 0,005$	$49,6 \pm 5,1$ $p_1 < 0,001$	$33,1 \pm 3,4$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,005$	$71,8 \pm 9,7$ $p_1 < 0,001$ $p_4 < 0,001$	$36,2 \pm 3,5$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$
IL-1 β	$36,6 \pm 2,6$	$54,2 \pm$	$39,3 \pm$	$57,1 \pm 6,1$ $p_1 < 0,001$	$37,3 \pm 2,5$	$56,9 \pm 8,8$ $p_1 < 0,001$	$38,4 \pm 4,2$	$48 \pm 3,4$	$45,4 \pm 4,7$
TNF α	$38,0 \pm 2,9$	$92 \pm 4,0$ $p_1 < 0,001$	$65,8 \pm 6,1$ $p_1 < 0,005$ $p_3 < 0,001$	$89,0 \pm 5,2$ $p_1 < 0,001$	$58,7 \pm 3,5$ $p_1 < 0,05$	$88,7 \pm 2,7$ $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	$60,2 \pm 1,9$ $p_1 < 0,001$	$105,0 \pm 9,6$ $p_1 < 0,001$	$87,2 \pm 6,7$ $p_1 < 0,001$ $p_4 < 0,005$

Примечание. p_1 – достоверность в сравнении с контролем; p_2 – достоверность в сравнении с группой, не имеющей мутации; p_3 – достоверность в сравнении с началом заболевания; p_4 – достоверность в сравнении с группой, имеющей мутацию C589T гена IL-4.

С другой стороны, у больных с отсутствием данной мутации усиленный синтез IL-8 при пиелонефритах позволяет интенсивнее и быстрее обеспечить блокировку воспаления, поскольку он выступает в качестве основного хемокина для стимуляции естественных киллеров, участвующих в уничтожении бактерий, вызывающих воспаление в почечном интерстиции.

У всех исследуемых пациентов отмечено повышение IFN- γ ($58,5 \pm 4,6$ пкг/мл – в начале исследования, против $22,7 \pm 2,0$ пкг/мл контрольной группы, $p < 0,001$), однако в период обратного развития концентрация данного интерферона снижалась почти в два раза ($33,9 \pm 2,4$ пкг/мл). Выявленные высокие значения показателя у детей с ПН в период разгара, содержащие в генотипе полиморфизм гена TNF α (G308A) в отличие от носителей C589T гена IL-4 могут определять неблагоприятный прогноз в отношении развития хронической почечной недостаточности.

Уровень IL-1 β также оказался увеличенным у изучаемых больных по сравнению с контролем до $54,25 \pm 4,4$ пкг/мл ($p < 0,05$) в начале заболевания. В период ремиссии показатель нормализовался, составив $39,3 \pm 2,3$ пкг/мл. Однако в группе детей-носителей полиморфизма G308A гена TNF α повышенные концентрации интерлейкина сохранялись и на момент выписки ($p < 0,05$), что могло продлить воспалительную реакцию в организме и повысить риск развития нефросклероза.

Уровень TNF α у детей с ПН повышался относительно контрольных показателей в 2,5 раза в период разгара и не имел различий в зависимости от типа мутаций, составив $88,7 \pm 2,7$ пкг/мл у носителей аллеля C589T гена IL-4 и $105,0 \pm 9,6$ пкг/мл – у носителей аллеля G308A гена TNF α , в отличие от больных, не имеющих мутаций ($89,0 \pm 5,2$ пкг/мл и $58,7 \pm 3,5$ пкг/мл, $p_1 < 0,005$). Данный полипептид способствует накоплению свободных радикалов и перекиси водорода в ткани, усиливает внутрисосудистые нарушения и синтез других провоспалительных цитокинов, приводя к фиброгенезу [2]. Ген, кодирующий фактор некроза опухолей α , представляет наибольший интерес для многих исследователей, полиморфизм гена может играть существенную роль в регуляции механизмов апоптоза, как одного из факторов, активизирующего склероз ткани [3].

Повышение концентрации противовоспалительного IL-4 при всех пиелонефритах в два раза в период разгара и практически в полтора раза в период ремиссии является ответной реакцией на ограничение воспаления в почечной ткани. Однако достаточно быстрое истощение резервов его эндогенной продукции при обструктивных пиелонефритах часто способствует последующей трансформации активной инфильтрации в

фиброгенез [2, 9, 10]. Различий в содержании IL-4 в зависимости от наличия или отсутствия исследуемых мутаций обнаружено не было – выявлено повышение его концентрации до $62,5 \pm 2,9$ пкг/мл ($p_1 < 0,001$) у больных с полиморфизмом в гене IL-4 и до $51,8 \pm 9,4$ пкг/мл – в гене TNF α ($p_1 < 0,05$).

Итак, для адекватного иммунного ответа необходима определённая реакция со стороны про- и противовоспалительных цитокинов, и нарушение их продукции приводит к глубоким дефектам в антиинфекционной защите. Обратимость или частичная обратимость изменений в цитокиновом статусе при воспалениях в почечной ткани носит регуляторный характер и свидетельствует о торможении процессов, ведущих к гломерулосклерозу и тубуло-интерстициальному фиброзу. Биологические эффекты цитокинов не всегда можно объяснить изменением их концентрации, присутствием и уровнем других цитокинов с синергичным, аддитивным или противоположным действием, иммуноглобулинов, направленности действия и структуры антигена, состоятельности механизмов ауторегуляции [8]. Изучаемые полиморфизмы находятся в промоторной области гена и могут оказывать влияние не только на интенсивность синтеза конкретного цитокина, но и на его функциональное состояние, изменяя течение и прогноз заболевания [2]. Полученные результаты могут свидетельствовать о различном влиянии изучаемых мутаций на особенности протекания иммунологических реакций при бактериальных воспалениях почек у детей.

Выводы

1. Среди здоровых детей, проживающих в Забайкалье, вариант СТ гена IL-4 выявляется чаще, чем вариант GA гена TNF α . При пиелонефритах у детей их встречаемость выше по сравнению со здоровыми.
2. У детей с пиелонефритами в момент поступления концентрации IL-1 β , IL-4, IL-8, TNF α , IFN- γ повышены, но в период ремиссии нормализуются показатели IL-1 β , IL-4 только при необструктивном пиелонефрите.
3. Присутствие аллельного варианта C589T гена IL-4 у пациентов с пиелонефритами сопровождается более низкими значениями концентрации IL-8 в начале заболевания.
4. Выявлены высокие показатели IFN- γ у носителей полиморфизма G308A гена TNF α в период ремиссии в сравнении с носителями полиморфизма C589T гена IL-4.
5. Присутствие мутации G308A гена TNF α (генотип A/A) предрасполагает к развитию нефросклероза при обструктивном пиелонефрите у детей.

Литература

1. Абдуллаев С. М. Генетические маркёры предрасположенности к агрессивному течению хронического гепатита С // Вестник российской академии медицинских наук. – 2007. – № 1. – С. 8–13.
2. Бехало В. А., Сысолятина Е. В., Нагурская Е. В. Регуляция врождённого иммунного ответа в очаге хронического воспаления // Иммунология. – 2009. – № 3. – С. 184–189.
3. Биктасова А. К. Роль белков-регуляторов программированной клеточной гибели в реализации проапоптотического эффекта фактора некроза опухоли альфа на лимфоциты крови: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2010. – 25 с.
4. Петросян Э. К. Генетические маркёры нефротического синдрома у детей // Нефрология. – 2006. – Т. 10, № 3. – С. 48–54.

5. Гончарова И.А. Влияние промоторного полиморфизма гена TNF α (G308A) на уровень фактора некроза опухолей альфа в сыворотке крови при хронических заболеваниях лёгких и печени: сборник научных трудов ГУ НИИ Медицинской генетики ТНЦ СО РАМН // Генетика человека и патология. – Томск, 2008. – С. 67.
6. Игнатова М.С. 36 Международный конгресс Европейской ассоциации педиатров-нефрологов: генетические и клинические аспекты нефрологии // Вестник перинатологии и педиатрии. – 2003. – Т. 48, № 3. – С. 63–64.
7. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 207 с.
8. Кетлинский С.А. Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.
9. Маянский А.Н. Патогенная микробиология: руководство. – Нижний Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. – 520 с.
10. Паунова С.С Патогенетические основы нефро-склероза (Обзор литературы) // Нефрология и диализ. – 2005. – Т. 7, № 2.
11. Рязанцева Н.В., Наследникова И.О., Коненков В.И. и др. Аллельный полиморфизм генов ИЛ-4 и ИЛ-10 как один из возможных механизмов, способствующих хронизации вирусных гепатитов // Иммунология. – 2007. – Т. 28, № 2 – С. 68–72.
12. Хворостов И.Н., Смирнов И.Е., Зоркин С.Н. Обструктивные уropатии у детей // Российский медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 50–54.

Координаты для связи с авторами: Батаева Елена Петровна – канд. мед. наук, ассистент кафедры пропедевтики детских болезней ЧГМА, тел. +7-914-352-12-70, e-mail: Bataeva73@mail.ru.

