

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ СОСУДИСТОЙ АДГЕЗИИ ПРИ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

Бережной А.Г., Дунаевская С.С.

ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, e-mail: Viktorpotapenk@yandex.ru

Целью данной работы явилось изучить экспрессию молекул сосудистой адгезии при развитии мочекаменной болезни. Проведен анализ историй болезни 90 пациентов с уролитиазом. Возраст пациентов, страдающих мочекаменной болезнью, в нашем исследовании составлял от 19 до 82 лет, при этом медиана по возрасту составила 54 [37; 69] года. Женщин было 23, что составляло 25,60%. У мужчин мочекаменная болезнь встречалась чаще – в 67 случаях, что составляло 74,40% в группе. Больные были разделены на две клинические группы: I клиническая группа – 45 пациентов с неосложненным течением мочекаменной болезни и II клиническая группа – 45 пациентов с мочекаменной болезнью, осложненной пиелонефритом. Фенотипирование лимфоцитов проводилось методом непрямой иммунофлюоресценции с помощью мышиных моноклональных антител к молекулам CD 31 и CD 38 – рецепторов лимфоцитов. В ходе полученных результатов было выявлено, что экспрессия CD 31 зависит как от развития уролитиаза, так и от его осложненного пиелонефритом течения. Процент CD 38 значительно возрастает у пациентов с осложненным течением уролитиаза вследствие усиления процесса трансэндотелиальной миграции лимфоцитов в зону воспалительного процесса. Таким образом, можно сделать вывод о наличии взаимосвязи между активностью экспрессии молекул сосудистой адгезии и развитием пиелонефрита при мочекаменной болезни.

Ключевые слова: мочекаменная болезнь, почка, пиелонефрит, молекулы сосудистой адгезии.

ALTERATIONS OF EXPRESSION OF VASCULAR ADHESION MOLECULES IN URINARY DISEASE

Berezhnoi A.G., Dunaevskaya S.S.

SBEI HPE KrasSMU named after prof. V.F. Voyno- Jaseneckiy Ministry of public health Russia, Krasnoyarsk, e-mail: Viktorpotapenk@yandex.ru

The purpose of this work was to study the expression of vascular adhesion molecules during the development of urolithiasis. The age of patients suffering from urolithiasis in our study was 19 to 82 years, with a median age of 54 [37; 69] years. There were 23 women, which was 25.60%. In men, urolithiasis was more common – 67 cases, which was 74.40% in the group. Patients were divided into two clinical groups: I clinical group – 45 patients with uncomplicated urolithiasis and II clinical group – 45 patients with urolithiasis complicated by pyelonephritis. Lymphocyte phenotyping was performed by indirect immunofluorescence using mouse monoclonal antibodies to CD31 and CD 38 lymphocyte receptors. In the course of the results, it was revealed that the expression of CD 31 depends both on the development of urolithiasis and its course complicated by pyelonephritis. The percentage of CD 38 increases significantly in patients with complicated urolithiasis by enhancing the process of transendothelial lymphocyte migration to the inflammatory process zone. Thus, it can be concluded that there is a relationship between the expression activity of vascular adhesion molecules and the development of pyelonephritis in urolithiasis.

Keywords: urea disease, kidney, pyelonephritis, vascular adhesion molecules.

Проблема уролитиаза в современном мире сохраняет свою актуальность в связи с неуклонным ростом заболеваемости и неблагоприятными эндемическими условиями [1–3]. В урологическом стационаре больных с мочекаменной болезнью и ее осложнениями, такими как пиелонефрит, цистит и иные, насчитывается от 30% до 50%. В структуре летальных исходов при урологической патологии мочекаменная болезнь стабильно занимает второе место [4–6].

Патогенез развития мочекаменной болезни определяет механизм камнеобразования. В сущности, процесс формирования конкрементов – это биохимический процесс, протекающий в организме, который нарушает коллоидное равновесие в моче [7, 8]. В нормальном состоянии моча является перенасыщенным раствором, и в ней не происходит камнеобразования, так как осуществляется растворение кристаллоидов защитными коллоидами. Недостаточное содержание в моче коллоидов приводит к формированию ядра камня, содержимым которого являются фибрин, сгусток крови, клеточный детрит, аморфный осадок, инородное тело. На сегодняшний день выдвинуты определенные теории камнеобразования. Матричная теория предполагает наличие инфекционного агента, слущенного эпителия, являющегося матрицей для формирования ядра камня. По коллоидной теории, в моче во взвешенном состоянии находятся коллоиды, переходя из лиофильного состояния в лиофобное, они кристаллизуются, так формируется камень. Согласно ионной теории, мочевого камень формируется при изменении pH мочи. Ингибиторная же теория предполагает дисбаланс ингибиторов и промоторов, которые поддерживают мочу во взвешенном состоянии и предотвращают выпадение ее в осадок, который затем приводит к образованию камней. При хроническом обезвоживании моча становится перенасыщенным раствором солей, поэтому, согласно теории преципитации и кристаллизации, мочевого камень может формироваться из кристаллов [9–11].

Однако современные исследования доказывают значимую роль иммуновоспалительного механизма в патогенезе развития и прогрессирования уролитиаза. Данный механизм реализуется посредством активации и взаимодействия эндотелиальных и иммунокомпетентных клеток. К основным функциям эндотелиальных клеток относят транспортную, барьерную, метаболическую, а также определяют их участие в синтезе цитокинов, экспрессии молекул адгезии. VCAM-1, E-селектин, P-селектин, ICAM-1, ICAM-2 относятся к основным молекулам адгезии. E-селектин экспрессируется на эндотелиальных клетках и относится к клеточным рецепторам клеток эндотелия, взаимодействует с лигандами, такими как сиалил Льюис X и L-селектин. Также E-селектин осуществляет роллинг и адгезию клеток к эндотелию сосудистой стенки. При увеличении в крови концентрации галектина-3 и VCAM-1 увеличивается смертность у пациентов с сердечно-сосудистой патологией. Галектин-3 относится к группе β -галактозид-связывающих протеинов, которые, в свою очередь, связывается с протеинами экстрацеллюлярного матрикса. Происходит экспрессия молекулы sICAM-1 на эндотелиальные клетки и лейкоциты крови, лимфоциты начинают взаимодействовать между собой, увеличивается их миграция через эндотелий сосудистой стенки. ICAM-1 включает в себя пять Ig-подобных внеклеточных доменов, которые мгновенно выявляют разные виды адгезивных лигандов, а также

находящиеся на В-лимфоцитах β 2-интегрины: CD11a/CD18, CD11b/CD18, что приводит к плотной имплантации клеток [12, 13].

Молекулы адгезии сосудистого эндотелия, относящиеся к семейству иммуноглобулинов, являются трансмембранными гликопротеинами и экспрессируются при развитии воспалительной реакции. Данная реакция осуществляется за счет адгезии лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов к эндотелию сосудов и миграции в очаг воспаления. Запускается многоэтапный процесс, включающий в себя прилипание, адгезию и трансэндотелиальную миграцию клеток через сосудистую стенку. Уровень молекул сосудистой адгезии в крови повышается при воспалительном ответе различной этиологии [14, 15].

Недостаточно изученными остаются вопросы патогенеза развития заболевания, в частности активность молекул сосудистой адгезии при формировании камней мочевыделительной системы, что и определило цель данного исследования.

Целью явилось изучить экспрессию молекул сосудистой адгезии при развитии мочекаменной болезни.

Материалы и методы исследования

В группу вошли 90 пациентов, страдающих мочекаменной болезнью (МКБ) и госпитализированных в отделение урологии ЧУЗ «Клиническая больница РЖД-Медицина» города Красноярск в период 2017–2010 гг. Обследование и установка диагноза были проведены согласно клиническим рекомендациям национального руководства по урологии.

Лечение пациентов проводилось с учетом нахождения мочевого камня в мочевыводящих путях, стадии заболевания и сопутствующей патологии. При почечной колике первостепенным является купирование боли. Хорошие результаты показывает применение спазмолитиков и неспецифических противовоспалительных средств (НПВС). НПВС оказывают двойное действие: уменьшают болевой синдром и снижают отек и воспаление слизистой лоханки или мочеточника в месте стояния камня. После проведенного лечения пациенту назначается камнеизгоняющая терапия: если камень самостоятельно не отходит или имеет крупные размеры, то пациенту предлагается провести дробление камня.

Возраст пациентов, страдающих мочекаменной болезнью, в нашем исследовании составлял от 19 до 82 лет, при этом медиана по возрасту составила 54 [37; 69] года. Женщин было 23, что составляло 25,60%. У мужчин мочекаменная болезнь встречалась чаще – в 67 случаях, что составляло 74,40% в группе.

В нашем исследовании пациентов с одиночными камнями было 69 (77,7%), тогда как со множественными – 21 (23,3%), коралловидные камни были диагностированы у 7 (7,8%) пациентов. Первичный уролитиаз был выявлен у 41 (45,6%) больного, рецидивный – у 45

(50,0%), резидуальные камни были диагностированы у 4 (4,4%) пациентов. Инфицированный уролитиаз диагностирован у 22 (24,4%) больных, большинство пациентов были с неинфицированными камнями, их число составило 68 (75,6%).

При анализе результатов рентгенологического обследования пациентов с мочекаменной болезнью были выявлены камни верхней и средней групп чашечек у 15 человек, что составило 16,6%, в почечной лоханке камни находились у 18 (20,0%) человек, а у 6 (6,6%) камни и кальцинаты располагались в чашечках обеих почек. Камни верхней трети мочеточника были у 41 (45,6%) пациента, в средней трети – у 9 (10,0%) и в нижней трети мочеточника – у 1 (1,1%).

Больные были разделены на две клинические группы: I клиническая группа – 45 пациентов с неосложненным течением мочекаменной болезни и II клиническая группа – 45 пациентов с мочекаменной болезнью, осложненной пиелонефритом.

Фенотипирование лимфоцитов проводилось методом непрямой иммунофлюоресценции с помощью мышиных моноклональных антител к молекулам различных CD-рецепторов лимфоцитов.

Проводили иммуногистохимию (ИГХ) биоматериала с античеловеческими CD38 и CD31.

1. Фиксировали биологический материал в 10%-ном растворе формалина, экспозиция составляла 15 мин, затем 2 мин промывали раствором PBS.

2. Материал фиксировали сывороткой, нанося на срез 15 микролитров 10%-ного раствора WGS (whole goat serum) в PBS. Держали во влажной камере 30 мин при температуре 37°C.

3. Добавив первичные мышиные античеловеческие антитела CD38, CD31 на срез, наносили также 15 микролитров первичных антител в пропорции 1:10 в 1%-ном растворе WGS в PBS. Держали 60 мин во влажной камере при температуре 37°C. Затем промывали раствором PBS.

4. Добавляли овечьи, антимишиные FITC-меченые антитела, затем в полной темноте наносили 15 микролитров вторичных антител в пропорции 1:100 в 1%-ном растворе WGS в PBS. Держали 30 мин во влажной камере при температуре 37°C. Затем промывали раствором PBS.

5. После окраски материала DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л) проводили микроскопию. Добавляли на срез 15 микролитров глицерин с PBS, в пропорции 1:1, с DAPI в пропорции 1:10. После накрывали стеклом, и материал был готов для флуоресцентной микроскопии, также с помощью зеленого фильтра выполняли окраску DAPI в ультрафиолетовом свете FITC-мечеными антителами.

Было исследовано 30 полей зрения в ультрафиолете и зеленом фильтре, посчитано число клеток с экспрессией CD38 или CD31 (светящихся в зеленом свете) относительно общего числа лимфоцитов, окрашенных DAPI (рис. 1 и 2). Забор крови для исследования проводился на 1-е сутки после госпитализации пациента в стационар и на 5-е сутки нахождения больного в стационаре.

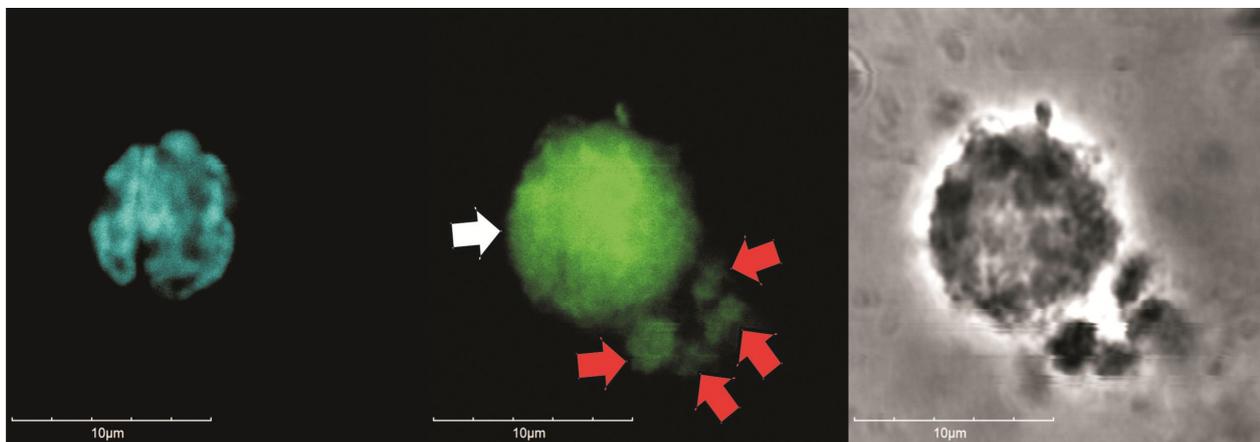


Рис. 1. CD38-экспрессирующий лимфоцит (конфокальная микроскопия, оптическое увеличение $\times 60$): слева – окраска ядра DAPI, в центре – CD38-экспрессирующий лимфоцит (белая стрелка), в окружении – CD38-экспрессирующие микрочастицы (красные стрелки), справа – фазово-контрастная микроскопия

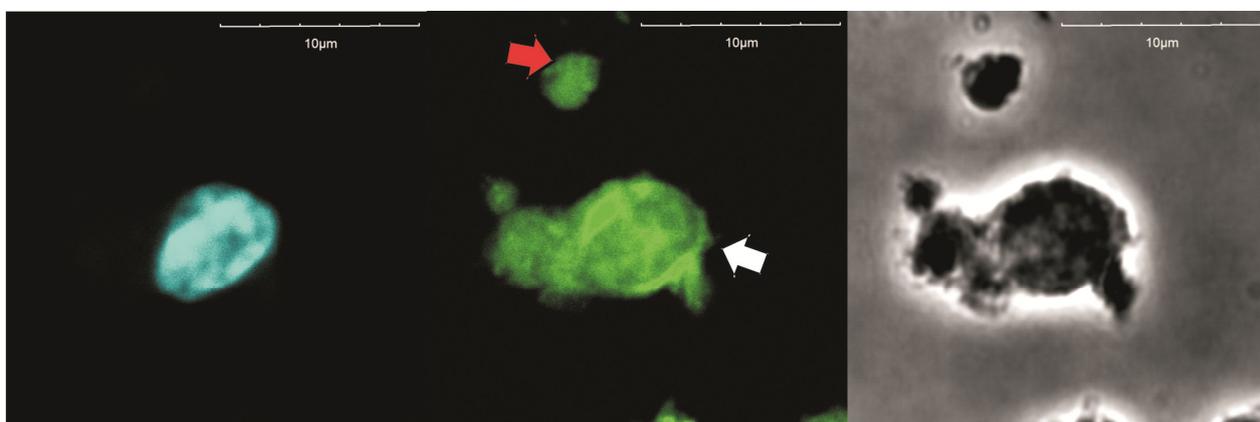


Рис. 2. CD31-экспрессирующий лимфоцит (конфокальная микроскопия, оптическое увеличение $\times 60$): слева – окраска ядра DAPI, в центре – CD31-экспрессирующий лимфоцит в блеббинге (белая стрелка), рядом – CD31-экспрессирующая микрочастица (красная стрелка), справа – фазово-контрастная микроскопия

Полученные данные обработаны статистически. Характер распределения исследуемых величин оценивали на основании теста Шапиро–Уилкса. Исследуемые величины не соответствовали нормальному распределению. При характере распределения,

отличном от нормального, описательная статистика представлена в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей, описанных как Me [25 перцентилей; 75 перцентилей]. Для выявления достоверных различий в группах применяли методы непараметрической статистики – критерии Манна–Уитни. Критический уровень статистической значимости при проверке нулевой гипотезы принимали равным 0,05. Статистический анализ данных проведен с помощью пакета анализа Ms Excel 10.0, программы Statistica for Windows 6.0. и программы SPSS Statistics V. 17.0. Результаты статистической обработки сведены в таблицы.

Результаты исследования и их обсуждение

При оценивании показателей экспрессии лимфоцитами CD 38 было установлено, что в I клинической группе данные соответствовали средним показателям группы контроля (14,24 [11,32; 16,54]). Во II клинической группе было зарегистрировано статистически значимое увеличение экспрессии лимфоцитами CD 38 (17,30 [15,45; 19,20]). Однако экспрессия лимфоцитами CD 31 была увеличена в обеих клинических группах и составила 17,89 [15,35; 21,02] и 25,50 [22,14; 28,31] соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Показатели молекул сосудистой адгезии у пациентов с мочекаменной болезнью на момент поступления

Показатели	Контрольная группа	I группа	II группа
Лимфоциты, активированные CD 38	12,40 [8,82; 15,07]	14,24 [11,32; 16,54] $p^1=0,467$	17,30 [15,45; 19,20] $p^1<0,001$ $p^2=0,028$
Лимфоциты, активированные CD 31	8,14 [6,03; 10,22]	17,89 [15,35; 21,02] $p^1 <0,001$	25,50 [22,14; 28,31] $p^1 <0,001$ $p^2 <0,001$

p^1 – достоверность различия между показателями контроля и исследуемой группой;

p^2 – достоверность различия между показателями групп I и II.

Отмечалось возрастание экспрессии CD 38, в I клинической группе показатель составил 16,28 [9,28; 19,15], $p^1=0,654$; во II клинической группе – 25,09 [21,95; 28,34], $p^1<0,001$. Однако экспрессия маркера CD 31 была более выражена и регистрировалась на показателях 26,31 [21,34; 30,68], 34,58 [31,21; 37,48] $p^1<0,001$ соответственно. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели молекул сосудистой адгезии у пациентов с мочекаменной болезнью на 5-е сутки стационарного лечения

Показатели	Контрольная	I группа	II группа
------------	-------------	----------	-----------

	группа		
Лимфоциты, активированные CD 38	12,40 [8,82; 15,07]	16,28 [9,28; 19,15] $p^1=0,654$	25,09 [21,95; 28,34] $p^1<0,001$ $p^2<0,001$
Лимфоциты, активированные CD 31	8,14 [6,03; 10,22]	26,31 [21,34; 30,68] $p^1<0,001$	34,58 [31,21; 37,48] $p^1<0,001$ $p^2<0,001$

p^1 – достоверность различия между показателями контроля и исследуемой группой;
 p^2 – достоверность различия между показателями групп I и II.

Заключение

Известно, что молекулы клеточной адгезии экспрессируются не только на эндотелиоцитах, но и на лимфоцитах, а затем оказывают влияние на миграцию лимфоцитов в очаг воспаления.

При развитии мочекаменной болезни происходит формирование дисфункции эндотелия, что проявляется значимым увеличением экспрессии CD 31 как на момент поступления больного ($p^1<0,001$), так и на 5-е сутки проводимого лечения. Можно предположить, что активация трансэндотелиальной миграции лимфоцитов способствует взаимодействию лейкоцитов с CD 31, что и приводит к адгезии лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов к эндотелию сосудов.

Процент CD 38 значимо возрастает у пациентов с осложненным течением уролитиаза в результате усиления процесса трансэндотелиальной миграции лимфоцитов в зону воспалительного процесса. Таким образом, можно сделать вывод о наличии взаимосвязи между активностью экспрессии молекул сосудистой адгезии и развитием пиелонефрита при мочекаменной болезни.

Список литературы

1. Daudon M., Knebelmann B. Epidemiology of urolithiasis. Rev. Prat. 2011. V. 61. P. 372-378.
2. Руденко В.И., Семенякин И.В., Малхасян В.А., Гаджиев Н.К. Мочекаменная болезнь // Урология. 2017. № 2. С. 30-63.
3. Аляев Ю.Г., Руденко В.И., Философова Е.В. Современные аспекты медикаментозного лечения больных мочекаменной болезнью // Русский медицинский журнал. 2004. Т. 12. № 8. С. 534-540.

4. Кривонос О.В., Скачкова Е.И., Малхасян В.А., Пушкарь Д.Ю. Состояние, проблемы и перспективы развития Российской урологической службы // Вестник Российского общества урологов. 2012. № 2. С. 26-32.
5. Россоловский А.Н., Березинец О.Л., Блюмберг Б.И. Мочекаменная болезнь: эволюция представлений // Bulletin of Medical Internet Conferences. 2014. № 4. С. 1-16.
6. Яненко Э.К., Меринов Д.С., Константинова О.В., Епишов В.А., Калиниченко Д.Н. Современные тенденции в эпидемиологии, диагностике, и лечении мочекаменной болезни // Экспериментальная и клиническая урология. 2012. № 2. С. 12-19.
7. Белай С.И., Довбыш М.А., Белай И.М. Мочекаменная болезнь: актуальность вопроса и перспективы его развития // Вестник ВГМУ. Украина. 2016. Т. 15. № 5. С. 19-26.
8. Яненко Э.К., Меринов Д.С., Константинова О.В. Современные тенденции в эпидемиологии, диагностике и лечении мочекаменной болезни // Экспериментальная и клиническая урология. 2012. № 3. С. 19-25.
9. Бережной А.Г., Винник Ю.С., Дунаевская С.С., Антюфриева Д.А. Возможности прогнозирования развития воспалительных осложнений послеоперационного периода у больных с мочекаменной болезнью // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2019. № 2:109. С. 113.
10. Abbott J.E., Deem S.G., Mosley N., Tan G., Kumar N., Davalos J.G. Are we fearful of tubeless percutaneous nephrolithotomy? Assessing the need for tube drainage following percutaneous nephrolithotomy. Urology Annals. 2016. № 8(1). P. 70-75.
11. Дзеранов Н.К. Лечение мочекаменной болезни – комплексная медицинская проблема. Качество жизни // Медицина. 2005. № 2 (9). С. 46-51.
12. Комелькова Л.В., Ионова В.Г. Молекулы адгезии и тромбоцитарно-сосудистый гемостаз у больных со стенозами внутренней сонной артерии атеросклеротического генеза // Тромбоз, гемостаз и реология. 2011. № 1 (45). С. 53-60.
13. Козырев А.Г., Суркова Е.А. Молекулы сосудистого эндотелия 1 типа у больных бронхиальной астмой // Ученые записки СпбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 2011. № 3. Т. 18. С. 38-40.
14. Комарова Е.Б. Изменения эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса и молекулы межклеточной адгезии в зависимости от тяжести течения ревматоидного артрита // Забайкальский медицинский вестник. 2015. № 2. С. 43-46.
15. Винник Ю.С., Дунаевская С.С., Деулина В.В. Особенности экспрессии молекулы сосудистой адгезии при остром панкреатите 1А фазы // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020. № 4 (176). С. 96-99.