

УДК 616-611.7:616-002.9

**ВМІСТ ПРО- І ПРОТИЗАПАЛЬНИХ
ЦИТОКІНІВ У КРОВІ ТА ЗМІНИ
ІНКРЕТОРНОЇ І КОНЦЕНТРАЦІЙНОЇ
ЗДАТНОСТІ НИРОК У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА
ГОСТРИЙ ГЕМАТОГЕННИЙ ОСТЕОМІЄЛІТ**

*А.Ю.Казанський, Б.М.Боднар
Буковинський державний медичний університет*

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

Резюме. Встановлено, що у дітей, хворих на гострий гематогенний остеомиєліт, у крові зменшується вміст інтерлейкіну-1 β і фактора некрозу пухлин α . Між даними двома прозапальними цитокинами виявлена пряма кореляційна залежність, тоді як концентрація в плазмі крові трансформувального фактора росту β 1 суттєво зростає і виявляє негативні кореляційні зв'язки як з рівнем у крові інтерлейкіну-1 β , так і з вмістом фактора некрозу пухлин α . У гострому періоді гематогенного остеомиєліту у хворих дітей вміст у крові молекул середньої маси перевищує контроль у 2,6 разу, рівень циркулюючих імунних комплексів – у 2,2 разу. У дітей, хворих на гострий гематогенний остеомиєліт, синдром ендогенної інтоксикації розвивається на тлі зменшення екскреторної і концентраційної здатності нирок при інтенсифікації їх інкреторної діяльності – підвищенні урокіназної активності сечі. Позитивна кореляція між концентрацією в крові інтерлейкіну-1 β і вмістом у плазмі крові креатиніну свідчить про певну роль даного цитокину в порушенні процесів гломерулярної ультрафільтрації.

Ключові слова: діти, остеомиєліт, нирки, урокіназа, цитокини.

СОДЕРЖАНИЕ ПРО- И ПРОИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ И ИЗМЕНЕНИЯ ИНКРЕТОРНОЙ И КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ПОЧЕК У ДЕТЕЙ. БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ГЕМАТОГЕННЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ.

А.Ю. Казанский, Б.Н. Боднар

Буковинский государственный медицинский институт

Резюме. Установлено, что у детей, больных острым гематогенным остеомиелитом, в крови уменьшается количество интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли α . Между данными двумя провоспалительными цитокинами выявлена прямая корреляционная зависимость, тогда как концентрация в плазме крови трансформирующего фактора роста β 1 существенно увеличивается и выявляет негативные корреляционные связи как с уровнем в крови интерлейкина-1 β , так и с содержанием фактора некроза опухоли α . В остром периоде гематогенного остеомиелита у больных детей содержание в крови молекул средней массы превышает контроль в 2,6 раз, уровень циркулирующих иммунных комплексов – в 2,2 раза. У детей, больных острым гематогенным остеомиелитом, синдром эндогенной интоксикации развивается на фоне уменьшения экскреторной и концентрационной способности почек при интенсификации их инкреторной деятельности – увеличение урокиназной активности мочи. Позитивная корреляция между концентрацией в крови интерлейкина 1 β и содержанием в плазме крови креатинина свидетельствует про определенную роль данного цитокина в нарушении процессов гломерулярной ультрафильтрации.

Ключевые слова: дети, остеомиелит, почки, урокиназа, цитокины.

THE BLOOD CONTENT OF PRO- AND ANTIINFLAMMATORY CYTOKINES AND CHANGES OF THE INCRETORY AND CONCENTRATING CAPACITY OF THE KIDNEYS IN CHILDREN AFFLICTED WITH ACUTE HEMATOGENOUS OSTEOMYELITIS

A. Yu. Kazanskyi, B.M. Bodnar

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Summary: At has been established that in children afflicted with acute hematogenous osteomyelitis there occurs a decrease of the blood content of interleukin 1 β and tumor α necrosis factor. A direct correlation between there two anti-inflammatory cytokines has been detected, whereas the blood plasma concentration of transforming growth factor β 1 elevates essentially and manifests negative correlations both with the blood interleukin level and with the tumor α necrosis factor content. The blood content of medium weight molecules exceeds the control group 2,6 times, the level of circulating immune complexes – 2,2 times in affected children during the acute period of hematogenous osteomyelitis. An children, suffering from acute hematogenous osteomyelitis, the syndrome of endogenous intoxication develops against a background of a decrease of the excretory and concentrating capacity of the kidneys in case of their intensified incretory activity – an increase of the urokinase urinary activity. A positive correlation between the blood interleukin 1 β and the blood plasma creatinine content is indicative of a certain role of this particular cytokine in a disturbance of the processes of glomerular ultrafiltration.

Key words: children, osteomyelitis, kidneys, urokinase, cytokines.

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

Вступ. Остеомієліт, як інфекційне ураження кісткової тканини, є однією з головних причин смертності при хірургічній патології дитячого віку [15]. Більшість випадків остеомієліту пов'язано з розповсюдженням патогенних чинників через кров – переважно *Staphylococcus aureus* [16]. Останній, як відомо, індукує секрецію фактора некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкіну-6 (IL-6) та IL-8 [18]. Потенційними джерелами прозапальних цитокінів вважаються остеобласти [17]. При післятравматичному остеомієліті високий рівень прозапальних цитокінів був виявлений в периферійній крові під час гострої фази захворювання, але не в хронічній його стадії [14]. Водночас при гематогенному остеомієліті не спостерігалось змін відносно контролю плазмових концентрацій таких цитокінів як TNF- α , IL-6 та IL-8 [12]. Крім того, вміст у крові прозапальних цитокінів, так само, як й їх продукція *ex vivo* лейкоцитами крові не корелювали з клінічними проявами остеомієліту [13]. Використовуючи кісткову тканину, отриману під час операції, автори останньої роботи встановили, що при гематогенному остеомієліті у дітей в ураженій кістці відбувається локальне підвищення вмісту TNF- α , IL-6 та IL-8, яке не супроводжується системним підвищенням концентрацій прозапальних цитокінів. Отже, не виключено, що саме відсутність системного цитокінового прозапального регуляторного сигналу призводить до погіршення неспецифічної резистентності організму хворих на остеомієліт дітей.

Мета роботи: з'ясувати зміни вмісту в крові інтерлейкіну-1 β , фактора некрозу пухлин α , трансформувального фактора росту β 1 та інкреторної і концентраційної діяльності нирок у дітей з гострим гематогенним остеомієлітом.

Матеріал і методи дослідження. Всього обстежено 67 дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт, віком від 5 до 18 (у середньому $x \pm Sx$). Діагноз виставляли на підставі скарг на болі, припухлість ураженого сегмента, обмеження рухів, опорної функції, різкий початок захворювання, підвищення t° тіла до 39-40 $^\circ$, даних об'єктивного обстеження: гіперемія, болючість при пальпації при осьовому навантаженні ураженого сегменту, зміни крові в перші дні захворювання були такими, як і при іншому гнійному процесі, тільки більш виражені, рентгенологічного дослідження. Серед хворих хлопчиків було 41 – 61,2 %, дівчаток 26 – 38,8%.

Епіфізарна форма захворювання була у 7 дітей – 10,2%. У решти пацієнтів місцем ураження частіше за все був метафіз з переходом на діафіз кістки. Ураження стегнової кістки відмічалось у 26 дітей – 38,7%, кісток гомілки у 22 – 32,3%, плечової кістки у 4 дітей – 6,4%, кісток тазу у 3-х – 5,5%, множинні ураження у 3-х – 4,7%, кісток передпліччя у 2-х – 3,5%, стопи у 2-х – 3,5%, інших кісток у 3-х – 4,7% пацієнтів.

Усі хворі були госпіталізовані на 3-5-у добу від початку захворювання у період вираженої ендогенної інтоксикації, про що свідчили такі клінічні ознаки як лихоманка, озноб, загальмованість, супорозний стан, запаморочення, загальна слабкість. Гострий, раптовий початок захворювання з високою температурою тіла (до 39-40 $^\circ$) спостерігався майже у 57 хворих – 85%. При поступленні в стаціонар тяжкий загальний стан відмічався у 50 дітей – 75%, середньої тяжкості у 17-ти – 25% пацієнтів. Токсичну форму захворювання діагностовано у 8 – 12% хворих, септикопиемічну у 33 дітей – 49,2%, місцеве ураження кістки спостерігалось у 26 – 38,8% випадків.

Контрольну групу, репрезентативну за віком і статтю, склали 20 дітей з незапальними захворюваннями фімоз, грижі які також лікувалися стаціонарно.

Відразу після госпіталізації у всіх пацієнтів з кубітальної вени забирали кров для імуноферментного визначення цитокінів і біохімічних досліджень. У якості стабілізатора використовували безнатрієву соль гепарину.

Рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) визначали за Гриневич Ю.А., Алферовим А.М. [1981] – спектрофотометрично, після інкубації зразків плазми крові у боратному буфері і поліетиленгліколі при кімнатній температурі. При інкубації

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

відбувається преципітація ЦК на поліетиленгліколі, що позначається на зміні оптичної щільності зразків. Вимір оптичної щільності проводили спектрофотометрично на “СФ-46” при довжині хвилі $\lambda=450$ нм проти боратного буфера.

Вміст у плазмі крові молекул середньої маси вивчали за модифікованою методикою Н.І. Габрисляна та співавторів [1984]. Плазму крові обробляли розчином трихлороцтової кислоти, надосадову рідину звільняли від грубодисперсних білків. Після попереднього розведення дистильованою водою здійснювали спектрофотометричну детекцію. За величиною оптичної щільності судили про вміст пептидів середньої молекулярної маси. Оптичною щільність зразків вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при $\lambda=254$ нм проти дистильованої води.

Аналіз вмісту цитокінів у плазмі крові проводили на імуноферментному аналізаторі “Униплан-М” (Росія) наборами реагентів “ProCon IL-1 β ” (ООО “Протеиновый контур”) для визначення інтерлейкіну-1 β (Росія), “ProCon TNF α ” (ООО “Протеиновый контур”) для визначення фактора некрозу пухлин α (Росія). Рівень в плазмі крові трансформувального фактора росту β_1 визначали методом імуноферментного аналізу реактивами фірми “R&D Systems. QuantikineTM - TGF β_1 ” (США). Екстракцію цитокінів проводили на мікроколонках С₂ AmprepTM (Велика Британія).

Концентрацію в сечі і плазмі крові креатиніну визначали за реакцією з пікриновою кислотою [2, 8] з реєстрацією показників екстинції за допомогою фотоколориметру “КФК-3” і спектрофотометру “СФ-46” [9]. Концентраційний індекс ендogenous креатиніну розраховували як співвідношення концентрацій креатиніну в сечі і плазмі крові [11].

Для визначення урокіназної активності сечі проводили інкубацію плазміногену із сечею (котра містила урокіназу), внаслідок чого відбувалась активація проферменту в активний плазмін, активність якого визначали за ступенем лізису азофібрину. Використовували три пронумеровані пробірки – 1 (Е₁), 2 (Е₂), 3 (Е₃). У перші дві вносили по 10 мг азофібрину, робочого буферного розчину (0,8 мл в першу та 0,9 мл в другу) і по 0,1 мл плазміногену. У першу і третю пробірки додавали по 0,1 мл сечі. Пробірки поміщали на одну год. у водяний термостат при температурі 37⁰С. Після інкубації в перші дві пробірки додавали по 3 мл, в третю – 3,9 мл дистильованої води і вміст кожної пробірки фільтрували через фільтрувальний пристрій. До профільтрованих розчинів додавали 0,02 мл 5н NaOH і визначали оптичну густину розчинів на фотоелектричному калориметрі “КФК-3” при довжині хвилі 440 нм (довжина оптичного шляху – 1 см). Урокіназну активність визначали за формулою: $УАС = (E_1 - E_2 - E_3) \times K$, де УАС - урокіназна активність сечі (од.), Е₁, Е₂, Е₃ – поглинання, відповідно, в першій, другій та третій пробірках; К – розрахунковий коефіцієнт.

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за програмою “BioStat” з визначенням t-критерію Ст’юдента [6].

Результати та їх обговорення. Результати дослідження наведені у таблиці. У дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт, концентрація в плазмі крові інтерлейкіну-1 β виявилась на 34,4% меншою за контрольні показники. Вміст у крові фактора некрозу пухлин α був на 45,2% меншим за контроль, тоді як плазмова концентрація трансформувального фактора β_1 , навпаки, на 89,9% перевищувала таку у пацієнтів контрольної групи.

Кореляційний аналіз показав, що у дітей з гострим гематогенним остеомієлітом існує високої сила пряма кореляційна залежність між вмістом у плазмі крові інтерлейкіну-1 β і фактора некрозу пухлин α ($y = 1,298 - 21,23x$; $r = 0,836$; $n = 17$, $p < 0,001$). Водночас концентрація в плазмі крові трансформувального фактора росту β_1 мала негативні кореляційні зв’язки з рівнем у крові інтерлейкіну-1 β ($y = -5,123 + 522,6x$; $r = -0,728$; $n = 17$, $p < 0,001$) та фактора некрозу пухлин α ($y = -3,275 + 414x$; $r = -0,722$; $n = 17$, $p < 0,01$).

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

Таблиця 1

Характеристика концентраційної здатності та інкреторної діяльності нирок і цитокінового про- і протизапального профілю у дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт ($x \pm Sx$)

Показники, що вивчалися	Контроль n=11	Остеомієліт n=17
Концентрація в плазмі крові інтерлейкіну-1 β , пг/мл	68,27 \pm 3,84	44,76 \pm 2,78 p<0,001
Концентрація в крові фактора некрозу пухлин α , пг/мл	67,27 \pm 3,73	36,88 \pm 4,32 p<0,001
Концентрація в крові трансформувального фактора росту β 1, пг/мл	154,40 \pm 9,99	293,20 \pm 19,60 p<0,001
Вміст у крові молекул середньої маси, ум. од.	0,106 \pm 0,008	0,272 \pm 0,020 p<0,001
Вміст у крові циркулюючих імунних комплексів, ум. од.	81,45 \pm 6,72	176,30 \pm 8,39 p<0,001
Концентрація креатиніну в сечі, ммоль/л	20,95 \pm 1,44	14,25 \pm 1,03 p<0,001
Концентрація креатиніну в плазмі крові, мкмоль/л	68,36 \pm 2,74	87,71 \pm 3,83 p<0,01
Концентраційний індекс ендogenous креатиніну, од.	309,00 \pm 20,74	162,90 \pm 10,02 p<0,001
Урокіназна активність сечі, од.	29,27 \pm 2,23	44,41 \pm 2,55 p<0,001

Примітка:

p – ступень достовірності різниць показників відносно контролю; n – кількість спостережень.

Встановлені кореляції є відзеркаленням відомих взаємовідносин у цитокіновій сітці регуляції імунної відповіді: інтерлейкін-1 β стимулює генерацію фактора некрозу пухлин α імунокомпетентними клітинами, тоді як протизапальні ефекти трансформувального фактора росту β 1 обумовлені його здатністю гальмувати секрецію флогенних цитокінів, у тому числі інтерлейкіну-1 β та фактора некрозу пухлин α [4].

Про високий ступень ендogenous інтоксикації у дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт, свідчило підвищення вмісту в крові молекул середньої маси, рівень котрих перевищував контроль у 2,6 разу. Крім того, у плазмі крові у 2,2 разу зростав вміст циркулюючих імунних комплексів. Водночас спостерігалось порушення екскреторної і концентраційної діяльності нирок: концентрація креатиніну в сечі зменшувалась на 32,0%, а вміст креатиніну в плазмі крові, навпаки, збільшувався і на 28,3% перевищував контрольні показники. Внаслідок зазначених змін концентраційний індекс ендogenous креатиніну знижувався майже вдвічі. Звертала на себе увагу інтенсифікація інкреторної діяльності нирок – урокіназна активність сечі збільшувалась

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

на 51,7%. Серед параметрів функціонального стану нирок та інших показників, що досліджувались, була встановлена лише одна середньої сили кореляційна залежність: концентрація в крові інтерлейкіну-1 β позитивно корелювала з плазмовим вмістом креатиніну ($y = 0,7374 + 54,69x$; $r = 0,536$; $n = 17$, $p < 0,05$).

Таким чином, у дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт, синдром ендогенної інтоксикації, який проявляється підвищенням вмісту в крові молекул середньої маси і циркулюючих імунних комплексів, супроводжується зменшенням екскреторної і концентраційної здатності нирок, про що свідчить зниження сечової концентрації креатиніну при зростанні вмісту останнього в крові та зменшенні концентраційного індексу ендогенного креатиніну. Підвищення урокіназної активності сечі вказує на інтенсифікацію інкреторної діяльності нирок.

Відомо, що нирки виконують функцію органа системи ендогенної детоксикації [10] і регулюють агрегатний стан крові через секрецію урокінази [1]. Зниження екскреторної і концентраційної здатності нирок у дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт, вказує на погіршення їх функціонального стану, що варто враховувати в клініці. Водночас інкреторна діяльність нирок у періоді захворювання, що досліджувався, не страждає, про що свідчить підвищення урокіназної активності сечі. Позитивна кореляція між концентрацією у плазмі крові інтерлейкіну-1 β і плазмовим вмістом креатиніну свідчить про певну роль даного цитокіну в порушенні процесів гломерулярної ультрафільтрації, скоріше за все, на рівні мезангіоцитів, скорочення відростків яких здатне обмежувати швидкість клубочкової фільтрації [3].

Висновки.

1. У дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт, у крові зменшується вміст інтерлейкіну-1 β і фактора некрозу пухлин α . Між даними двома прозапальними цитокінами виявлена пряма кореляційна залежність, тоді як концентрація в плазмі крові трансформувального фактора росту $\beta 1$ суттєво зростає і виявляє негативні кореляційні зв'язки як з рівнем у крові інтерлейкіну-1 β , так і з вмістом фактора некрозу пухлин α .

2. У гострому періоді гематогенного остеомієліту у хворих дітей вміст у крові молекул середньої маси перевищує контроль у 2,6 разу, рівень циркулюючих імунних комплексів – у 2,2 разу.

3. У дітей, хворих на гострий гематогенний остеомієліт, синдром ендогенної інтоксикації розвивається на тлі зменшення екскреторної і концентраційної здатності нирок при інтенсифікації їх інкреторної діяльності – підвищенні урокіназної активності сечі. Позитивна кореляція між концентрацією в крові інтерлейкіну-1 β і вмістом у плазмі крові креатиніну свідчить про певну роль даного цитокіну в порушенні процесів гломерулярної ультрафільтрації.

Література

1. Балуда В.П. Физиология системы гемостаза. – М.: Медицина, 1995. – 293 с.
2. Берхин Е.Б., Иванов Ю.И. Методы функционального исследования почек. – Барнаул: Алтайск. кн. изд-во, 1972. – 199 с.
3. Вандер А. Физиология почек. – СПб.: Питер, 2000. – 256 с.
4. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые средства. – К.: Наукова думка, 1998. – 313 с.
5. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лаб. дело. – 1984. – № 3. – С.138-140.
6. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
7. Гриневич Ю.А., Алферов А.М. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. – 1981. – № 8. – С.493-495.
8. Мерзон А.К. Способ определения концентрации креатинина в плазме крови // Лаб. дело. – 1974. – № 3. – С.21-24.
9. Мерзон А.К., Титаренко О.Т., Андреева Е.К. Сравнительная оценка методов химической индикации креатинина // Лаб. дело. – 1970. – № 7. – С.416-418.
10. Наточин Ю.В. Архитектура физиологических функций: тот же фундамент, новые грани // Российский физиологический журнал им. И.П. Сеченова. – 2002. – Том 88, № 2. – С.129-143.
11. Наточин Ю.В. Основы физиологии почки. – Л.: Медицина, 1982. – 207 с.

ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

12. Evans C.A.W., Jellis J., Hughes S.P.F. et al. Tumor necrosis factor- α , interleukine-6 and interleukine-8 secretion and the acute phase response in patients with bacterial and tuberculous osteomyelitis // *J. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 177. – P.1582-1587.
13. Fullilove S., Jellis J., Huges S.P.F. et al. Local and systemic concentration of tumor necrosis factor- α , interleukine-6 and interleukine-8 in bacterial osteomyelitis // *Med. Hyg.* – 2000. – Vol. 94. – P.221-224.
14. Klosterhalfen B., Peters K.M., Tons C. Et al. Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis // *J. Trauma.* – 1996. – Vol. 40. – P.372-378.
15. Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis // *New England J. Med.* – 1997. – Vol. 336. – P.999-1007.
16. Mader J.T., Calhoun J. Osteomyelitis. – In.: *Principles and Practice of Infectious Diseases* / Eds. G.L. Mandel, J.E. Bennet, R. Dolin. – New York: Churchill Livingstone, 1995. – Vol.1. – P.1039-1051.
17. Rothe L., Collin-Osdoby P., Chen Y. Et al. Human osteoclasts and osteoclast-like cells synthesize and release high basal and inflammatory stimulated levels of the potent chemokine interleukin-8 // *Endocrinology.* – 1998. – Vol. 139. – P.4353-4363.
18. Standiford T.J., Arenberg D.A., Danforth J.M. et al. Lipoteichoic acid induces secretion of intrleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis // *Infect. Immun.* – 1994. – Vol. 62. – P.119-125.

Адреса для листування:

Казанський Антон Юрійович
лікар ортопед-травматолог дитячий
Лікарня швидкої медичної допомоги (ЛШМД)
вул. Фастівська 4, роб. тел. 69214, 69246.
