

Маркеры системного воспаления как предикторы тяжести типичного гемолитико-уремического синдрома у детей

Т.Е. Панкратенко^{1,2}, О.В. Москалец³

¹ Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа

ГБУЗ «Детская городская клиническая больница Св. Владимира ДЗМ»,
107014, Российская Федерация, Москва, ул. Рубцовско-Дворцовая, д. 1/3

² Кафедра трансплантологии, нефрологии и искусственных органов ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
129110, Российская Федерация, Москва, ул. Щепкина, 61/2

³ Научно-исследовательская лаборатория ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
129110, Российская Федерация, Москва, ул. Щепкина, 61/2

Markers of systemic inflammation as predictors of the severity of typical hemolytic uremic syndrome in children

T.E. Pankratenko^{1,2}, O.V. Moskalets³

¹ Center of gravitational blood surgery and hemodialysis, St. Vladimir's Children's City Clinical Hospital,
1/3 Rubtsovsko-Dvortsovaya str., Moscow, 107014, Russian Federation

² Department of Transplantology, Nephrology and Artificial Organs, Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), 61/2 Shchepkina str., Moscow, 129110, Russian Federation

³ Research laboratory, Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI),
61/2 Shchepkina str., Moscow, 129110, Russian Federation

Ключевые слова: гемолитико-уремический синдром, дети, интерлейкин-6, интерлейкин-10, фактор некроза опухоли альфа

Резюме

Типичный гемолитико-уремический синдром (тГУС) – тяжелое заболевание из группы тромботических микроангиопатий, патогенез которого связан с повреждением эндотелия, обусловленным действием шига-токсина (Stx) и выбросом провоспалительных и просклеротических цитокинов активированными лейкоцитами и макрофагами. Маркеры системного воспаления, в частности, провоспалительные цитокины и их растворимые рецепторы, могут обладать прогностической ценностью при тГУС как предикторы тяжести заболевания.

Цель исследования: определение сывороточных концентраций ФНО α и рФНО α , ИЛ-6 и рИЛ-6, ИЛ-10 у детей в острой фазе тГУС, а также оценка их информативности как маркеров тяжести и длительности заболевания.

Материалы и методы: сывороточная концентрация вышеуказанных цитокинов и их рецепторов была исследована методом твердофазного иммуноферментного анализа у 30 пациентов в острой фазе тГУС на 2–4 сутки заболевания. Группу сравнения составил 21 ребенок в катамнезе тГУС.

Результаты: сывороточная концентрация ФНО α и рФНО α , ИЛ-6 и рИЛ-6, ИЛ-10 у детей в острой фазе тГУС была достоверно выше, чем в группе катамнеза. В подгруппе больных с тяжелым течением

Адрес для переписки: Панкратенко Татьяна Евгеньевна

e-mail: t.pankratenko@inbox.ru

Corresponding author: Tatiana Pankratenko

e-mail: t.pankratenko@inbox.ru

тГУС была достоверно выше сывороточная концентрация ИЛ-6, а также лейкоцитоз, сывороточная концентрация СРБ и ЛДГ, ниже уровень компонента комплемента С3. Выявлена статистически значимая связь с неблагоприятным течением тГУС лейкоцитоза более $13,5 \times 10^9/\text{л}$ (ОШ 13,75, 95% ДИ 1,45-130,25), уровня СРБ $>9 \text{ мг/л}$ (ОШ 7,80, 95% ДИ 1,48-41,22), снижения С3 $<90 \text{ мг/л}$ (ОШ 28,60, 95% ДИ 2,89-283,07), а также повышения уровня какого-либо из цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10, рФНО (ОШ 7,86, 95% ДИ 1,41-47,04).

Заключение: выраженный лейкоцитоз и повышенный уровень СРБ, низкий уровень С3, а также повышение уровня ИЛ-6 и/или ИЛ-10 и/или рФНО α у пациентов с тГУС было статистически значимо связано с тяжелым течением заболевания, что позволяет рассматривать эти факторы в качестве предикторов тяжести тГУС.

Abstract

Typical hemolytic-uremic syndrome is a severe disease of thrombotic microangiopathies. Its pathogenesis is associated with Stx-induced damage to the endothelium and the release of pro-inflammatory and pro-sclerotic cytokines by activated leukocytes and macrophages. Markers of systemic inflammation, in particular, proinflammatory cytokines and their soluble receptors, may have prognostic value for tHUS as predictors of disease severity.

Objective: to determine serum concentrations of TNF α and rTN, IL-6 and rIL-6, IL-10 in children with the acute phase of tHUS and to evaluate their informativeness as predictors of the disease's severity and duration.

Materials and methods: The serum concentration of the above cytokines and their receptors was measured by ELISA in 30 patients in the acute phase of tHUS. The comparison group consisted of 21 children in the follow-up period of tHUS.

Results: serum concentration of TNF α and rTNF, IL-6 and rIL-6, IL-10 was significantly higher in children with acute-phase tHUS than in the follow-up group. In the subgroup of patients with severe tHUS, the serum concentration of IL-6 was significantly higher, as well as leukocytosis, the serum concentration of CRP and LDH, and the level of complement component C3 was lower. A statistically significant relationship with tHUS course was found for leukocytosis more than $13.5 \times 10^9/\text{L}$ (OR 13.75, 95% CI 1.45-130.25), CRP level $>9 \text{ mg/L}$ (OR 7.80, 95% CI 1.48-41.22), a decrease in C3 $<90 \text{ mg/L}$ (OR 28.60, 95% CI 2.89-283.07), as well as increase in the level of any of the cytokines IL-6, IL-10, rTNF (OR 7.86, 95% CI 1.41-47.04).

Conclusion: prominent leukocytosis and increased CRP level, low C3 level, as well as increased levels of IL-6 and/or IL-10 and / or rTNF in patients with tHUS were statistically significantly associated with the severe course of the disease, which allows us to consider these factors as predictors of the severity of tHUS.

Key words: hemolytic-uremic syndrome, children, interleukin-6, interleukin-10, tumor necrosis factor alfa

Введение

Типичный (диарея-ассоциированный) гемолитико-уремический синдром (тГУС) – заболевание из группы тромботических микроангиопатий (ТМА), причиной которого является инфекция, вызванная шига-токсин-продуцирующими микроорганизмами (Stx): энтерогеморрагической кишечной палочкой (enterohemorrhagic *Escherichia coli* – ЕНЕС), шигеллой Флекснера, реже – энтероагрегативной кишечной палочкой, кампилобактером. Заболевание поражает чаще всего детей от 6 мес до 5 лет, хотя возможно в любом возрасте. Оно проявляется развитием триады симптомов, а именно гемолитической анемии, тромбоцитопении и острого почечного повреждения после продромального периода острой кишечной инфекции, часто гемоколита. [1, 2]

ТГУС – тяжелое заболевание, протекающее с потребностью в заместительной почечной терапии (ЗПТ) более чем у 60% пациентов, с поражением ЦНС в 20-40% случаев. У ряда больных развивается тяжелая полиорганная недостаточность. Леталь-

ность при тГУС составляет 2,9-5%. [2, 3]. Остается серьезным долгосрочный прогноз: у 1% пациентов происходит необратимая потеря функции почек, у 25-30% через несколько месяцев или лет после перенесенного тГУС развивается протеинурия, артериальная гипертензия, хроническая болезнь почек. Вероятность неблагоприятных последствий тГУС тем выше, чем дольше сохраняется анурия и потребность в диализе. До настоящего времени актуальна проблема прогнозирования течения тГУС и предотвращения осложнений и неблагоприятных исходов. [1, 2]

Патогенез тГУС связан с вызванным Stx повреждением эндотелия капилляров, прежде всего почечных. Проникая в клетку, Stx угнетает синтез белка на рибосомах, вызывая так называемый риботоксический стресс, а при массивном воздействии – гибель клетки. При этом эндотелий утрачивает антитромботический фенотип. Поврежденные эндотелиальные клетки активно экспрессируют протромботические и провоспалительные факторы, в частности, фактор Виллебранда (ФВ), провоцируют агрегацию тром-

боцитов. Образование микротромбов в капиллярах различных органов приводит к их ишемическому повреждению, прежде всего, к развитию острого почечного повреждения (ОПП), а также к потреблению тромбоцитов и неиммунному гемолизу, т.е. формируется «триада» ГУС. Повреждение эндотелия усугубляется активацией комплемента и выбросом провоспалительных и просклеротических цитокинов активированными лейкоцитами и макрофагами. [1, 2].

Ранее было показано, что высокий лейкоцитоз в дебюте тГУС является предиктором тяжести течения заболевания [3, 4], тогда как молекулы межклеточной адгезии, которые являются биомаркерами эндотелиальной дисфункции, в этом плане малоинформативны [5]. Можно предположить, что и другие маркеры системного воспаления, такие как фактор некроза опухоли-альфа (ФНО α), растворимый рецептор к ФНО α (рФНО α), интрелейкин-6 (ИЛ-6) и растворимый рецептор к ИЛ-6 (рИЛ-6), а также противовоспалительный цитокин интерлейкин-10 (ИЛ-10) могут обладать прогностической ценностью при тГУС в плане риска кортикального некроза, неврологического поражения, полиорганной недостаточности.

Целью данной работы было исследование сывороточных концентраций ФНО α и рФНО α , ИЛ-6 и рИЛ-6, ИЛ-10 у детей в острой фазе тГУС, а также оценка их информативности как маркеров тяжести заболевания.

Материалы и методы

В 2018 г. нами было обследовано 30 пациентов (17 мальчиков, 13 девочек) в острой фазе тГУС и 21 ребенок (12 мальчиков, 9 девочек) в катамнезе, находившиеся на лечении и наблюдавшиеся в Центре гравитационной хирургии крови и гемодиализа ГБУЗ ДГКБ св. Владимира ДЗМ в 2017-2018 гг.

Критериями включения детей основной группы были:

- наличие триады ГУС: 1) анемия <100 г/л при отрицательных антиэритроцитарных аутоантителах; 2) повышение сывороточного уровня ЛДГ выше двух норм; 3) тромбоцитопения $<150 \times 10^9$ /л;
- острое почечное повреждение (ОПП) – уровень креатинина выше нормы для данного возраста);
- продромальный период острой кишечной инфекции с гемоколитом и/или выделение из стула энтерогеморрагической *E.coli*.

В исследование не включались дети с другими причинами ОПП, такими, как гломерулярные заболевания почек, тубуло-интерстициальный нефрит, инфекции, осложненные тяжелой системной воспалительной реакцией и синдромом полиорганной недостаточности, а также дети, у которых был установлен диагноз атипичного ГУС.

В группу сравнения вошли дети, перенесшие тГУС, диагностированный на основании вышеуказанных симптомов, в сроки от 6 месяцев до 5 лет до настоящего обследования, не имевшие на момент обследования признаков интеркуррентной инфекции или какого-либо другого хронического заболевания. Дети из группы сравнения были достоверно старше: возраст пациентов в основной группе составил 37 ± 25 месяцев (медиана 28 мес), в группе сравнения – 63 ± 47 месяцев (медиана 44 мес), $p=0,02$.

Клинико-лабораторное обследование детей основной группы и группы сравнения включало физикальный осмотр, определение уровня артериального давления, ультразвуковое исследование почек с доплерографией, исследование лабораторных показателей, характеризующих активность ТМА и гемолиза (гемоглобин, тромбоциты, ЛДГ), выраженность воспаления (лейкоциты, С-реактивный белок, С3 компонент комплемента), состояние системы коагуляции (РФМК, Д-димер), степень почечного повреждения (мочевина, креатинин). За референсные значения показателей были приняты нормы лаборатории ДГКБ св. Владимира. Пробы сыворотки для исследования содержания ФНО α и рФНО α (60 кДа), ИЛ-6 и рИЛ-6, ИЛ-10 детям в острой фазе тГУС брали в первые сутки от поступления в отделение (на 2-4 сутки от появления симптомов тГУС), до трансфузии препаратов крови и проведения процедур заместительной почечной терапии, детям группы сравнения – при плановом катамнестическом обследовании. Пробы крови центрифугировали через 30 мин после забора, до проведения анализа сыворотку хранили в морозильнике при -28°C . Определение вышеуказанных цитокинов и их растворимых рецепторов проводили в научно-исследовательской лаборатории ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы eBioscience (Австрия). Учет результатов проводили на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (Awareness Technology, США). Референсные значения содержания цитокинов в сыворотке крови указаны в соответствии с описаниями к тест-системам.

Критериями тяжелого течения тГУС в острой фазе были анурия длительностью 8 и более суток, тяжелое поражение ЦНС (генерализованные судороги, кома) с потребностью в ИВЛ, летальный исход. Течение заболевания с олигурией или с анурией до 7 суток без симптомов поражения ЦНС расценивалось как умеренно тяжелое.

Продромальная диарея длительностью 2-6 дней присутствовала у всех пациентов основной группы. У 19 (63%) пациентов продромальная диарея имела характер гемоколита (стул небольшими порциями со слизью и примесью крови, до 12-15 раз в сутки), у 11 (37%) диарея протекала в виде энтероколита (разжиженный стул со слизью, до 8-10 раз в сутки).

Лихорадка выше $38,5^{\circ}\text{C}$ на высоте кишечного синдрома отмечалась у 9 (30%) детей, у остальных температура тела была субфебрильной. Этиология кишечной инфекции была установлена у 14 (47%) пациентов: у двоих – посевом из стула ЕНЕС (до поступления в отделение), у 12 – обнаружением в стуле ДНК ЕНЕС методом ПЦР.

тГУС проявлялся ухудшением общего самочувствия, нарастающей вялостью, бледностью, пастозностью подкожной клетчатки или отеками, олигоанурией. Судороги оказались первым симптомом тГУС у двоих (7%) детей.

На момент обследования у 23 (76,7%) пациентов сохранялись проявления энтероколита и гемоколита в виде разжиженного стула со слизью и примесью крови 2-7 раз в сутки, 7 (23,3%) детей лихорадили выше $38,5^{\circ}\text{C}$ у 10 (33,3%) пациентов отмечался субфебрилитет, у остальных 13 (43,3%) температура была нормальной. Анурия развилась у 20 (66,7%) детей, олигурия – у 10 (33,3%). Неврологическая симптоматика отмечалась у 10 (33,3%) детей: у двоих – судорожный синдром, у остальных судороги сочетались с нарушением сознания различной выраженности (от сопора до глубокой комы).

По данным УЗИ, у всех пациентов в остром периоде тГУС выявлены изменения паренхимы почек и кровотока: повышение эхогенности коркового слоя почек при нормальной или пониженной эхогенности пирамидок, обеднение сосудистого рисунка, снижение скорости кровотока на магистральных сосудах почек, повышение индексов резистентности.

В заместительной почечной терапии (ЗПТ) нуждались 24 (80,0%) пациента. Показаниями к ЗПТ у 20 пациентов явилась анурия более суток, у 4 – олигурия в сочетании с отеками, приростом концентрации креатинина более 120 мкмоль/л в сутки. Стартовым методом ЗПТ у 7 детей явился перитонеальный диализ, у 17 – продленная вено-венозная гемодиализация. 5 детей с анурией более 7 суток были в дальнейшем переведены на перитонеальный диализ.

Все дети с тГУС в остром периоде получали антибактериальную терапию внутривенно антибиотиками группы цефалоспоринов III и IV поколения. По показаниям назначалась антигипертензивная терапия нифедипином (15 пациентов), противосудорожная терапия конвулексом (8 пациентов). Инфузии плазмы в дозе $15\text{-}20\text{ мл/кг}$ № 1-5 (медиана 2) проведены 15 (50%) пациентов. Стероидная, иная противовоспалительная или иммуносупрессивная терапия не проводилась.

Дети контрольной группы (катамнез тГУС) при физикальном осмотре были клинически здоровы, не получали медикаментозной терапии, не имели симптомов текущей интеркуррентной инфекции и ТМА. Следовая протеинурия (менее $0,1\text{ г/л}$ в общем анализе мочи) обнаружена у троих, протеинурия $0,3\text{ г/л}$ – у одного, у остальных белок в моче

не определялся. Показатели азотовыделительной функции почек у всех пациентов были в пределах нормы. Ультразвуковая картина почек соответствовала норме у 15 пациентов, минимальные изменения (незначительное повышение эхогенности паренхимы, обеднение кортикального кровотока) выявлены у 5, признаки нефросклероза (уменьшение размеров почек, гиперэхогенность паренхимы, обеднение и снижение скоростей кровотока на внутрипочечных артериях) – у двоих.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы STATISTIKA 12,0 (Statsoft, США), а также с использованием статистических калькуляторов на сайте medstatistic.ru (<https://medstatistic.ru/index.php>) Поскольку распределение количественных данных для ряда показателей отличалось от нормального, в группах рассчитывалась медиана (М), нижний и верхний квартили (Q1 и Q3). Различия между группами оценивались по критерию Манна-Уитни для независимых переменных. Для выявления корреляции между показателями использовался коэффициент корреляции Спирмана (непараметрический). Связь исхода с факторами риска оценивали, рассчитывая отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ), а также по анализу таблиц сопряженности с определением точного критерия Фишера (с учетом малого числа наблюдений).

Различия между группами и коэффициенты корреляции считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В таблице 1 представлены лабораторные данные пациентов основной и контрольной групп.

Уровни гемоглобина и тромбоцитов были ниже нормы, а уровень АДГ, креатинина, РФМК и Д-димера резко повышен у 100% детей в остром периоде тГУС. В контрольной группе эти показатели были незначительно повышены лишь в 20% случаев.

У 19 (63,3%) детей отмечался лейкоцитоз более $13,5 \times 10^9/\text{мкл}$, у 15 (50%) – повышение уровня СРБ выше 9 мг/л . У 16 (53,3%) больных основной группы уровень С3 компонента комплемента был ниже нормы, тогда как у всех детей контрольной группы он был в пределах референсных значений ($90\text{-}140\text{ мг/л}$).

Содержание цитокинов и их растворимых рецепторов у детей основной и контрольной групп представлены в таблице 2.

У детей группы сравнения уровень исследованных цитокинов не выходил за пределы референсных показателей, а рФНО α не определялся (0 пг/мл) у 47,6% детей контрольной группы. В острой фазе тГУС у детей отмечались как нормальные, так и повышенные значения. Уровень ФНО α и рецептора к ИЛ-6 был в пределах нормы (хотя и выше, чем у здоровых) у всех обследованных больных. Повы-

Таблица 1 | Table 1

Лабораторные показатели детей в острой фазе и в катамнезе тГУС, медиана (Q1-Q3)
Laboratory data in the acute phase and follow-up in children with tHUS, median (Q1-Q3)

	Острая фаза тГУС*, n=30	Катамнез тГУС, n=21
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	408,5 (209,0-577,0)	46,5 (37,7-56,5)
Гемоглобин, г/л	74,1 (66,0-82,0)	124 (116-132)
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	71,5 (54-92)	298 (266-3290)
Лактатдегидрогеназа, % от верхней границы нормы	1033 (842-1463)	104 (84,5-122)
Лейкоциты, *10 ⁹ /л	14,7 (10,1-17,6)	6,0 (5,4-8,3)
С3 компонент комплемента, мг/л	87 (76-98)	116 (104-129)
С-реактивный белок, мг/л	9,4 (0,0-28,0)	0,0 (0,0-2,5)
Растворимые фибрин-мономерные комплексы, мг%	7,5 (6,0-11,0)	4,0 (0,0-5,0)
Д-димер, нг/дл	2864 (1478-6150)	169 (151-216)

* различия по всем показателям достоверны, $p < 0,0001$. тГУС – типичный гемолитико-уремический синдром

Таблица 2 | Table 2

Сывороточная концентрация цитокинов и их растворимых рецепторов у детей в острой фазе и в катамнезе тГУС, медиана (Q1-Q3)
Serum concentration of cytokines and their soluble receptors in the acute phase and follow up in children with tHUS, median (Q1-Q3)

Показатель (нормальные значения)	Острая фаза тГУС, n=30	Ремиссия тГУС, n=21	p (критерий Манн-Уитни)
ФНО α , нг/мл (0-6)	3,4 (2,2-4,6)	1,9 (1,8-2,2)	0,003
рФНО (60 кД), нг/мл (1,47-4,16)	3,2 (1,4-4,2)	0,1 (0,0-0,4)	0,001
ИЛ-6, пг/мл (0-12,7)	17,1 (13,2-67,9)	2,8 (2,6-3,0)	0,000
рИЛ-6, пг/мл (65,9-202,7)	187,5 (150-225)	125 (100-150)	0,019
ИЛ-10, пг/мл (7,9-12,9)	8,7 (6,8-79,4)	6,1 (5,2-9,1)	0,018

тГУС – типичный гемолитико-уремический синдром, ФНО α – фактор некроза опухоли альфа, рФНО – рецептор фактора некроза опухоли, ИЛ-6 – интерлейкин 6, рИЛ-6 – рецептор интерлейкина 6, ИЛ-10 – интерлейкин 10

Таблица 3 | Table 3

Лабораторные показатели детей с умеренно тяжелым и тяжелым течением тГУС, медиана (Q1-Q3)
Laboratory data in children with moderately severe and severe course of tHUS, median (Q1-Q3)

Показатели	Умеренно тяжелое течение тГУС, n=18	Тяжелое течение тГУС, n=12	p (критерий Манн-Уитни)
Возраст, мес	28,5 (20-60)	27 (22-48)	0,882
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	358 (195-493)	413 (352-627)	0,325
Гемоглобин, г/л	69,7 (61,0-80,0)	78,0 (70,5-90,5)	0,097
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	76,5 (54,0-100,0)	70,5 (51,5-86,0)	0,320
Лактатдегидрогеназа, % от верхней границы нормы	941 (734-1245)	1241 (1028-1620)	0,030
Лейкоциты, *10 ⁹ /л	11,4 (9,8-15,8)	18,3 (14,8-21,6)	0,008
С-реактивный белок, мг/л	5,1 (0,0-14,3)	30,3 (7,25-120,4)	0,017
С3 компонент комплемента	93,5 (88,0-102,0)	81,0(72,0-85,0)	0,003
Растворимые фибрин-мономерные комплексы	8,0 (6,5-11,0)	7,0 (4,5-12,0)	0,451
Д-димер	2186 (965-5043)	4656 (1478-7660)	0,194

шение ИЛ-6 у 11 (36,7%), ИЛ-10 у 4 (13,3% детей), рФНО α выявлено у 4 (13,3%) пациентов. В целом, повышение хотя бы одного из исследованных показателей отмечалось у 17 (56,7%) пациентов.

В группе сравнения уровень исследованных цитокинов не выходил за пределы референсных значений, а рФНО α не определялся (0 пг/мл) у 47,6% детей контрольной группы.

У 12 (40%) детей в острой фазе тГУС заболевание имело тяжелое течение: у 9 отмечались неврологические симптомы (генерализованные судороги, нарушение сознания), трое детей с тяжелым поражением

ЦНС погибли на 3-5 сутки от дебюта; у всех выживших детей этой группы длительность анурии составила более 7 суток (от 8 до 21 суток, медиана 12), что сопряжено с высоким риском развития ХБП в исходе тГУС.

При сравнении исходных показателей детей с тяжелым и умеренно тяжелым течением тГУС оказалось, что у детей с тяжелым течением тГУС были выше показатели активности воспаления (лейкоцитоз и СРБ), уровень ЛДГ, ниже уровень компонента комплемента С3. Показатели активации коагуляции (РФМК, Д-димер) не различались в двух группах (табл. 3).

Таблица 4 | Table 4

Сывороточная концентрация цитокинов и их растворимых рецепторов у детей с умеренно тяжелым и тяжелым тГУС, медиана, (Q1-Q3)
Serum concentration of cytokines and their soluble receptors in children with severe and moderately severe tHUS, median (Q1-Q3)

Показатель (нормальные значения)	Умеренно тяжелое течение тГУС, n=18	Тяжелое течение тГУС, n=12	p (критерий Манн-Уитни)
ФНО α , нг/мл (0-6)	3,8 (3,4-4,6)	2,8 (2,0-4,5)	0,423
рФНО α , (60 кД) нг/мл (1,5-4,2)	3,2 (1,4-3,8)	3,4 (1,6-6,1)	0,481
ИЛ-6, пг/мл (0-12,7)	14,3 (3,2-25,5)	102,3 (18,2-185,0)	0,042
рИЛ-6, пг/мл (65,9-202,7)	187,5 (162,5-262,5)	187,5(125,0-225,0)	0,754
ИЛ-10, пг/мл (7,9-12,9)	8,65 (6,8-25,1)	7,4 (6,8-121,8)	0,193

тГУС – типичный гемолитико-уремический синдром, ФНО α – фактор некроза опухоли альфа, рФНО – рецептор фактора некроза опухоли, ИЛ-6 – интерлейкин 6, рИЛ-6 – рецептор интерлейкина 6, ИЛ-10 – интерлейкин 10

Таблица 5 | Table 5

Факторы риска тяжелого течения тГУС у детей
Prevalence of risk factors in children with moderately severe and severe course of tHUS

	Умеренно тяжелое течение тГУС, n=18	Тяжелое течением тГУС, n=12	ОШ (95% ДИ)	Точный критерий Фишера	p
Лейкоцитоз >13,5*10 ⁹ /мкл	8	11	13,75 (1,45-130,25)	0,018	<0,05
С-реактивный белок >9 мг/л	5	9	7,80 (1,48-41,22)	0,024	<0,05
С3 компонент комплемента <90 мг/л	5	11	28,60 (2,89-283,07)	0,001	<0,05
Повышение уровня ИЛ-6 и/или ИЛ-10 и/или рФНО α	7	10	7,86 (1,41-47,04)	0,026	<0,05

тГУС – типичный гемолитико-уремический синдром, рФНО – рецептор фактора некроза опухоли, ИЛ-6 – интерлейкин 6, ИЛ-10 – интерлейкин 10

Содержание цитокинов в сыворотке крови у детей с тяжелым и умеренно тяжелым течением тГУС достоверно не различалось, кроме ИЛ-6, значимо повышенного в группе детей с тяжелым течением тГУС (табл. 4).

При расчете отношения шансов выявлена статистически значимая связь исхода (тяжелого течения тГУС) с такими факторами риска, как лейкоцитоз, повышенный сывороточный уровень СРБ, сниженный уровень С3, а также повышенное содержание какого-либо из цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10, рФНО α (табл. 5).

Выявлены достоверные ($p < 0,05$) положительные корреляции уровня ИЛ-6 и СРБ ($r = 0,76$), отрицательная корреляция ИЛ-6 и уровня С3 ($r = -0,68$). Уровень ИЛ-10 достоверно ($p < 0,05$) коррелировал с количеством лейкоцитов при поступлении ($r = 0,44$).

Длительность анурии положительно коррелировала с количеством лейкоцитов при поступлении ($r = 0,64$, $p < 0,05$), уровнем СРБ при поступлении ($r = 0,46$, $p < 0,05$), а также с уровнем ИЛ-10 ($r = 0,77$, $p < 0,05$).

Следует отметить, что максимальные уровни СРБ отмечены у трех умерших больных. У одного из умерших отмечен крайне высокий уровень ИЛ-6 (200 пг/мл).

Мы не выявили корреляций между уровнем ФНО α и рФНО, ИЛ-6 и рИЛ-6. Не выявлено также корреляций между ФНО α /рФНО, ИЛ-6/рИЛ-6 и количеством лейкоцитов, уровнем СРБ, длительностью анурии.

Таким образом, у детей в острой фазе тГУС в сравнении с группой катамнеза выявлен более вы-

сокий уровень ряда провоспалительных цитокинов и повышение уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Длительность анурии коррелировала с лейкоцитозом, уровнем СРБ, а также с уровнем ИЛ-10. В подгруппе детей с тяжелым течением тГУС были достоверно выше лейкоцитоз, уровень СРБ, АДГ и ниже уровень С3. При расчете ОШ лейкоцитоз, повышение СРБ и снижение С3, наряду с повышением уровня цитокинов, оказались статистически значимо связанными с тяжелым течением тГУС.

Обсуждение

Мы выявили повышение содержания ряда цитокинов и их рецепторов в сыворотке крови детей в остром периоде тГУС, а также их связь, наряду с другими маркерами воспаления, с тяжестью течения заболевания. Необходимо отметить, что наше исследование имеет ряд ограничений. Число наблюдений было небольшим вследствие редкости заболевания. Дети поступали на 2-4-ые сутки от появления симптомов тГУС, следовательно, пробы крови набраны в разные сроки от начала заболевания, что, учитывая быструю динамику выработки и потребления цитокинов при острых состояниях, могло повлиять на содержание их в сыворотке крови. Исследование явилось одномоментным, т.е. мы не оценивали динамику уровня цитокинов у пациентов с тГУС в течение острого периода.

Тем не менее, в целом наши результаты подтверждают неблагоприятное влияние выраженного системного воспаления на течение тГУС. Цитокины, являющиеся медиаторами воспалительного ответа,

активно задействованы в патогенезе многих заболеваний [6, 7] и, вероятно, играют роль в патогенезе тГУС. Действительно, показано, что ФНО α и ИЛ-6 провоцируют выделение клетками эндотелия мультимеров фактора Виллебранда (ФВ), участвующих в агрегации тромбоцитов и в образовании капиллярных микротромбов. Кроме того, ИЛ-6 взаимодействует с мультимерами ФВ, снижая скорость их расщепления металлопротеазой ADAMTS 13 [8]. Известно также, что ФНО α способствует усилению экспрессии рецептора Stx – глоботриацерамида на клетках эндотелия капилляров почек и тубулярного эпителия, сердца, головного мозга, повышая их восприимчивость к Stx [8].

Продукция цитокинов запускается шига-токсином и другими факторами вирулентности ЕНЕС еще в продромальной фазе тГУС. В эксперименте *in vitro* Brandelli et al на линии макрофаго-подобных клеток ТНР-1 показали, что обработка их Stx1 и Stx2 приводила к усилению секреции ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО α , а также некоторых хемокинов [9]. В аналогичном эксперименте моноциты здоровых доноров, инкубированные с Stx 1, выделяли ряд провоспалительных цитокинов и хемокинов, в том числе ФНО α и ИЛ-6 [10]. Ledesma et al показали, что воздействие флагеллина – белка адгезивных микроворсинок ЕНЕС – в культуре поляризованных клеток кишечника (Т84 и НТ-29) и некишечных эпителиальных клеток HeLa приводит к усилению ими синтеза ИЛ-8 и ФНО α (но не ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10) [11].

В нашем исследовании уровни цитокинов выше референсных были обнаружены не у всех пациентов с тГУС, что совпадает с результатами ранее проведенных исследований. Так, van der Kar N et al выявили выраженное повышение сывороточного уровня ИЛ-6 у 4-х из 13 пациентов с тГУС, причем у всех четырех течение заболевания было более тяжелым, с экстраренальными (неврологическими) проявлениями, тогда как уровень ФНО α не отличался от такового у здорового контроля, уровень рФНО α был умеренно повышен, но не отличался от такового у детей с тХПН [12]. Inward et al обнаружили повышенный уровень ФНО α , ИЛ-6, а также ИЛ-1 β и ИЛ-8 лишь у небольшой части детей с тГУС (а также у некоторых детей контрольной группы) [13]. Вероятно, это связано с ранним усилением секреции ФНО α после воздействия инфекционного агента, в то время как симптоматика тГУС развивается через несколько суток от начала ЕНЕС-инфекции, часто на фоне стихания или разрешения кишечного синдрома. Пик продукции ИЛ-6 на фоне инфекции достигается после пика ФНО α , чем можно объяснить более частое и выраженное повышение уровня ИЛ-6 в группе пациентов в острой фазе тГУС. Вероятно, у наших пациентов уровень ФНО α к моменту обследования уже снизился, а ИЛ-6, который начинает продуцироваться в более поздние сроки, в части случаев был повышен. В исследовании Shimizu M. et al со-

общается, что уровни ФНО α , рФНО α I и II типа, ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови больных ЕНЕС-индуцированным геморрагическим колитом быстро нарастают, а максимальные концентрации отмечаются за 1 день до постановки диагноза тГУС. [14]. Но в более поздней работе этой группы исследователей показано, что основными сывороточными биомаркерами развития тГУС являются нарастание концентраций рИЛ-6 и рФНО α II [15].

Известно, что определение содержания провоспалительных цитокинов, их растворимых рецепторов и их соотношения имеет прогностическое значение при ряде тяжелых заболеваний, в частности, при сепсисе [16]. В вышеупомянутых работах группы Shimizu M. et al. показано, что у больных с тяжелым течением тГУС содержание всех цитокинов (кроме ФНО α) и их растворимых рецепторов было достоверно выше, чем при более легком варианте. В то же время, у пациентов с острой энцефалопатией концентрация ФНО α была существенно выше [14, 15]. В нашем исследовании в подгруппе детей с тяжелым течением тГУС был достоверно повышен провоспалительный цитокин ИЛ-6, наряду с такими показателями активности воспаления, как лейкоцитоз и СРБ. ФНО α , рФНО α I, рИЛ-6, а также соотношения ФНО α /рФНО α и ИЛ-6/рИЛ-6 не явились значимыми предикторами тяжести течения тГУС.

В нашем исследовании повышение уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-10 оказалось неблагоприятным фактором: сывороточная концентрация ИЛ-10 прямо коррелировала с длительностью анурии у выживших больных. Ассоциация высокого уровня ИЛ-10 с тяжестью заболевания и неблагоприятными исходами показана при сепсисе и других заболеваниях с системным воспалительным ответом. В частности, в обзоре Chaundry et al приведены данные, что гиперпродукция, особенно персистирующая, ИЛ-10 при сепсисе является предиктором тяжелого течения и фатального исхода [17]. Неблагоприятное влияние высоких уровней ИЛ-10 на течение сепсиса может быть связано с его иммуносупрессивным действием: подавлением синтеза провоспалительных цитокинов и интерферона γ , необходимых для реализации противомикробного ответа. [18, 19]. Возможно также, что более высокий уровень ИЛ-10 соответствует более выраженному системному воспалению в продромальном периоде тГУС.

В работе Ng P C et al выявлено одновременное повышение про- и противовоспалительных цитокинов у недоношенных новорожденных с системной инфекцией, причем у погибших детей было значимо выше и нарастало в динамике соотношение ИЛ6/ИЛ10 [20]. Аналогичные данные получены Matsumoto et al, изучавших цитокиновый профиль у септических больных пожилого возраста. Наиболее выраженное повышение по сравнению с контролем отмечено для ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1

и ИЛ-10, в то время как средний уровень ФНО α на протяжении заболевания практически не отличался от контрольной группы. При этом у пациентов в критическом состоянии уровни этих цитокинов были значимо выше, чем у больных с менее тяжелым течением заболевания. Таким образом, «цитокиновая сеть» в острой фазе сепсиса была сформирована одновременно про- и противовоспалительными цитокинами. [21]

Повышение значимое ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 (но не ФНО α) выявлено также у недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом [22].

Можно предположить, что при тГУС максимально активная секреция цитокинов происходит на высоте инфекционного процесса с поражением кишечника, в момент продромальной Stx-емии, т.е. в продромальном периоде тГУС. В последующем, при уже развившейся симптоматике ГУС (как у наших пациентов) токсинемия снижается, секреция цитокинов идет на спад и, поскольку время полужизни цитокинов *in vivo* короткое, уровень их в плазме крови снижается. ИЛ-10 может являться как маркером выраженного системного воспаления (поскольку секреция его запускается провоспалительными цитокинами), так и оказывать собственное неблагоприятное воздействие на патологический процесс при тГУС путем избыточной иммуносупрессии.

Повышенный уровень ИЛ-6, ИЛ-10, рФНО чаще встречался в подгруппе детей с тяжелым течением тГУС (ОШ 7,86, 95% ДИ 1,41-47,04), что совпало с большей распространенностью в этой группе лейкоцитоза, повышенного уровня СРБ и сниженного уровня С3 (табл. 5). Можно сделать вывод, что повышение уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 у детей с тГУС обладает прогностической ценностью наряду с другими вышеуказанными маркерами воспаления. Определение ФНО α и рФНО α у пациентов с уже возникшим тГУС вряд ли целесообразно.

Заключение

В сыворотке крови детей в острой фазе тГУС по сравнению с контрольной группой выявлено повышение уровня ряда цитокинов и их рецепторных антагонистов: ФНО α , рФНО α , ИЛ-6, рИЛ-6, ИЛ-10. Наибольшие различия отмечены в содержании ИЛ-6. Уровень ФНО α при наличии статистически достоверных различий не превышал нормальных значений. При сравнении больных с тяжелым и умеренно тяжелым течением заболевания наиболее значимые различия получены по уровню ИЛ-6. Уровень ИЛ-10 коррелировал с длительностью анурии. Повышенный лейкоцитоз, уровень СРБ, низкий уровень С3, а также повышение уровня ИЛ-6 и/или ИЛ-10 и/или рФНО α у пациентов с тГУС было статистически значимо связано с тяжелым те-

чением заболевания, что позволяет рассматривать эти факторы в качестве предикторов тяжести тГУС.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Authors declare no conflict of interest

Список литературы

1. Эмирова Х.М., Толстова Е.М., Казан М.Ю. и др. Гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шига-токсин продуцирующей *Escherichia coli*. Нephрология; 2016; 20(2):18-32.
Emirova KhM, Tolstova YEM, Kagan MYU, i dr. Gemolitiko-uremicheskiy sindrom, assotsirovanny s shiga-toksin produtsiruyushchey Escherichia coli. Nephrologiya; 2016; 20(2):18-32.
2. Bnyand M, Mariani-Kurkjian P, Gouali M et al. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Médecine et maladies infectieuses. 2018; 48: 167-174
3. Ardissino G, Dacco V, Testa S et al. Hemoconcentration: a major risk factor for neurological involvement in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2015; 30(2): 345-52.
4. Ardissino G, Tel F, Possenti I, Testa S et al. Early volume expansion and outcomes of hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics.* 2016; 137(1): e20152153
5. Панкратенко Т.Е., Москалец О.В., Абасеева Т.Ю. Клинико-диагностическое значение определения растворимых молекул адгезии sICAM и sVCAM у детей с типичным гемолитико-уремическим синдромом. Вопросы практической педиатрии; 2017; 12(4): 7-14.
Pankratenko T.Ye., Moskalets O.V., Abaseyeva T.YU. Kliniko-diagnosticheskoye znacheniye opredeleniya rastvorimyykh molekul adgezii sICAM i sVCAM u detey s tipichnym gemolitiko-uremicheskim sindromom. Voprosy prakticheskoy pediatrii; 2017; 12(4): 7-14.
6. Палеев Ф.Н., Белокопытова И.С., Минченко Б.И., Москалец О.В. Роль цитокинов в патогенезе ишемической болезни сердца. Креативная кардиология. 2011; 1: 75-80.
Paleyev F.N., Belokopytova I.S., Minchenko B.I., Moskalets O.V. Rol' tsitokinov v patogeneze ishemicheskoy bolezni serdtsa/Kreativnaya kardiologiya. 2011; 1: 75-80.
7. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. – Монография. СПб.:Фолиант. 2018. 512 с.
Simbirtsev A.S. Tsitokiny v patogeneze i lechenii zabolovaniy cheloveka. – Monografiya– SPb:Foliant. 2018. 512 s
8. Moake J. Thrombotic Microangiopathies: Multimers, Metalloprotease, and Beyond. *Clin Transl Sci.* 2009 Oct; 2(5): 366-373.
9. Brandelli JR, Griener TP, Laing A et al. The effects of Shiga toxin 1, 2 and their subunits on cytokine and chemokine expression by human macrophage-like THP-1 cells toxins (Basel). 2015; 7(10): 4054-4066.
10. Brigotti M, Carnicelli D, Arfilli V et al. Human monocytes stimulated by Shiga toxin 1a via globotriaosylceramide release proinflammatory molecules associated with hemolytic uremic

syndrome. *Int J Med Microbiol.* 2018; 308(7):940-946.

11. *Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A et al.* The Hemorrhagic Coli Pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 Is an Inducer of Proinflammatory Cytokine Secretion in Intestinal Epithelial Cells. 2010; *PLoS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0012127

12. *Van der Kar N, Sauerwein R, Demacker P et al.* Plasma cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Nephron* 1995; 71: 309-313

13. *Inward C, Varagunam M, Adu D et al.* Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Archives of Disease in Childhood* 1997; 77(2): 145-147

14. *Shimizu M, Kuroda M, Sakashita N et al.* Cytokine profiles of patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111-induced hemolytic-uremic syndrome. *Cytokine.* 2012; 60(3): 694-700.

15. *Shimizu M, Kuroda M, Inoue N et al.* Extensive serum biomarker analysis in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111-induced hemolytic-uremic syndrome. *Cytokine.* 2014; 66(1): 1-6.

16. *Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C et al.* Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003; 35(9): 535-544. DOI: 10.1080/00365540310015935.

17. *Chaundry H, Zhou J, Zhong J et al.* Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In Vivo.* 2013; 27(6): 669-684

18. *Schulte W, Bernhagen J, Bucala R.* Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/165974>

19. *Castillo P, Kolls J K.* IL-10: A Paradigm for Counterregulatory Cytokines. *J Immunol* 2016; 197:1529-1530

20. *Ng PC, Li K, Wong RP et al.* Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003; 88(3): F209-13

21. *Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K et al.* The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Scientific Reports* 2018; 8:13995 DOI:10.1038/s41598-018-32275-8 1

22. *Benkoe T, Baumann S, Weninger M et al.* Comprehensive evaluation of 11 cytokines in premature infants with surgical necrotizing enterocolitis. *PLoS One.* 2013; 8(3): e58720.

Дата получения статьи: 20.09.2019

Дата принятия к печати: 19.12.2019

Submitted: 20.09.2019

Accepted: 19.12.2019