

# Генетические предикторы хронизации пиелонефрита у детей

Т.А. Крючко, В.П. Остапенко, А.В. Луканин

ВГУЗ «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

В настоящее время проблема пиелонефрита крайне важна и многообразна. При лечении пациентов с данной нозологией врачи разных специальностей сталкиваются с некоторыми трудностями. Одним из современных подходов в предупреждении развития нефрологической патологии является генетическое прогнозирование риска ее формирования. Цель нашего исследования – с современных позиций оценить значимость генетических маркеров в реализации хронического пиелонефрита (ХП) в детском возрасте и проанализировать их ассоциации с характером микрофлоры и особенностями течения ХП у детей. Полученные результаты подтверждают важную роль Toll-подобных рецепторов в реализации врожденного иммунного ответа и позволяют рассматривать полиморфизм гена Toll-подобного рецептора 4 в качестве дополнительного прогностического показателя в генетических исследованиях.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, полиморфизм, Toll-подобные рецепторы, внутриклеточные возбудители.

Проблема инфекций мочевой системы (ИМС) крайне важна и многообразна. Данная категория пациентов широко представлена в повседневной работе врачей общей практики, нефрологов, педиатров, урологов и гинекологов. Пиелонефрит (ПН) относится к самым распространенным ИМС, обуславливая как высокие показатели острой заболеваемости, так и стойкое длительное поражение почек. Лечение ПН бывает успешным далеко не у всех больных. По данным литературы у 86% детей реинфицирование наблюдается через 6 мес после первичного эпизода [1–3, 7, 8]. При этом риск формирования рубцов в почках зависит от количества эпизодов инфекций мочевыводящих путей (ИМП). Формирование рубцов сопровождается необратимым повреждением паренхимы почек, приводя к снижению парциальной функции почек и ранней инвалидизации пациентов молодого возраста [4–6].

Одним из современных подходов в предупреждении развития патологии является генетическое прогнозирование риска ее формирования. Однако как и многие другие мультифакториальные нозологии, ПН – сложный предмет для генетических исследований. Широкий клинический полиморфизм, генетическая гетерогенность – это далеко не весь перечень препятствий, с которыми сталкиваются ученые.

Возникновение и хронизация воспаления в мочевой системе определяется не только свойствами возбудителя, но и индивидуальными особенностями макроорганизма-хозяина (прежде всего, способность давать адекватный иммунный ответ), что является отражением его генетической структуры. Реализация функции врожденной иммунной системы в значительной степени осуществляется за счет семейства Toll-подобных рецепторов (TLR), которые играют решающую роль в ранней защите организма от патогенов. В последние годы было доказано, что именно TLR принимают участие в распознавании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) и активации врожденного иммунитета. В то же время *Escherichia coli* ответственна за развитие более 80% всех ИМП и вызывает как асимптомную бактериурию, так и симптоматические ИМП [9, 10]. В процессе исследования с использованием экспериментальных моделей восходящих ИМП в эпителиальных клетках

мочевого пузыря и канальцев почек мышей и человека были получены четкие свидетельства того, что почечный воспалительный ответ на бактерии *E. coli* с фимбриями типа 1 или Р действительно зависит от TLR4 [9, 10].

Не меньшей проблемой, чем *E. coli* в генезе инфекций мочевых путей, как у детей, так и у взрослых являются внутриклеточные возбудители, а именно *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* [14, 17–19]. Установлено, что именно эти возбудители играют ведущую роль в развитии рецидивирующего течения инфекций мочевой системы и при этом часто протекают как микст-инфекции с бактериальной флорой [8, 9, 13]. Существует ряд исследований, которые свидетельствуют о том, что наличие мутаций гена TLR4 повышает риск заражения урогенитальными инфекциями, такими как хламидиоз, микоплазмоз, уреоплазмоз, гарднереллез, трихомоноз [11, 12, 15, 16].

Поскольку различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут определять разный характер течения воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций при внедрении чужеродных агентов, их изучение у детей с хроническим ПН представляет особый интерес [7, 14–16].

**Цель исследования:** с современных позиций оценить значимость генетических маркеров в реализации хронического пиелонефрита в детском возрасте и проанализировать их ассоциации с характером микрофлоры и особенностями течения ХП у детей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено клинико-лабораторное обследование 60 детей, больных хроническим пиелонефритом в период обострения, которые находились на стационарном лечении в педиатрическом отделении № 2 (нефрологические койки) детской областной клинической больницы г. Полтавы.

Отбор биологических образцов от пациентов проводили при отсутствии инфекционных заболеваний. Материалом для исследования была периферическая венозная кровь. Генотипирование полиморфного участка *Asp299Gly* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием олигонуклеотидных праймеров.

Бактериологическое исследование мочи с определением микробного возбудителя и его чувствительности к антибактериальным и химиотерапевтическим препаратам, а также молекулярно-биологическое исследование (полимеразная цепная реакция для определения *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*; материал исследования – соскоб эпителиальных клеток с мочеиспускательного канала) у большинства больных осуществляли до назначения антибактериальной терапии.

Группу контроля составили 95 практически здоровых лиц из базы генетических образцов НИИ генетических и иммунных основ развития патологии и фармакогенетики ВГУЗУ «УМСА».

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «STATISTICA for Windows 7.0» (StatSoft Inc) и электронных таблиц MS Excel. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесия Харди–Вайнберга с помощью критерия

$\chi^2$ . Для сравнения частот аллелей между исследуемыми группами использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность при числе степеней свободы, который равен 1.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в развитии ХП у обследованных больных приоритетными факторами оказались возраст и пол ребенка. Установлено, что ХП чаще встречается у девочек (89%) с преимущественным возрастом 1–4 года (63%), причем заболевание имеет I (57,7%) или II (26,2%) степень активности.

Большое значение в развитии ХП имеет наследственность: у пациентов развитие патологии было связано с отягощенным семейным анамнезом (68,5%), особенно по материнской линии (37,7%), или двумя линиями родословной (13,1%), представленная преимущественно в форме ПН (33,9%) или цистита (40,8%). Следует заметить, что наследуется единственная склонность по нефрологической патологии, которая реализуется в данном случае в виде ИМС с преимущественным поражением почечной ткани.

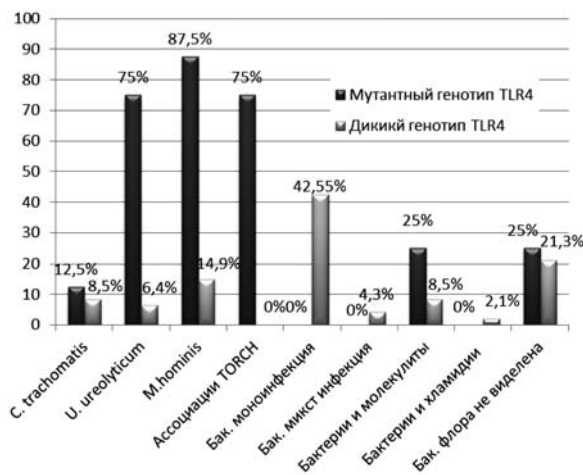
На развитие ХП влияет патология беременности (68,5%), в частности нефропатия, TORCH-инфекция (53,9%) и ОРВИ во время беременности (40,8%). Перечисленные факторы по данным многих исследователей [1–3, 6, 8] приводят к повреждению плаценты, формированию антенатальной гипоксии плода, перинатальному поражению центральной нервной системы, функциональной незрелости иммунной системы, что, впоследствии изменяет механизмы физиологической адаптации, уменьшая иммунную толерантность к воздействию различных факторов.

Среди факторов риска можно выделить пороки развития мочевыделительных путей (МВП) у ребенка, частые ОРВИ, дисбактериоз кишечника, инфекции половых органов, которые подтверждались корреляционными связями между данными факторами и ранним возрастом манифестации ХП (соответственно:  $\tau=0,26$ ;  $\tau=0,29$ ;  $\tau=0,29$ ;  $\tau=0,21$  и  $\tau=0,28$ ).

У детей с обострением ХП при бактериологическом исследовании мочи доминировала грамотрицательная условно-патогенная флора, что объясняется преобладающим восходящим путем инфицирования и резервуаром указанной флоры в кишечнике. В частности в структуре выделенных возбудителей преобладали *E.coli* (26,8%) и клебсиелла (12,3%). Среди других грамотрицательных возбудителей определяли протей (10,0%), энтеробактерии (7,7%) и синегнойную палочку (6,2%). Микробные ассоциации регистрировали в 5,4% случаев, причем они были представлены грамотрицательной флорой или ассоциацией с кокками и грибковой флорой.

Исследование методом ПЦР у детей с обострением ХП продемонстрировало преобладание микоплазменной инфекции (20%), второе место заняла уреоплазма (11,6%), наименьшее количество составили дети с хламидийной инфекцией (8,3%). Ассоциации возбудителей регистрировали в 6,7% случаях, причем они были представлены молекулами (уреоплазмой и микоплазмой). Суммарный процент определения внутриклеточных возбудителей в нижних отделах мочевой системы у обследованных детей составил практически 40%.

При определении генетической предрасположенности человека к той или иной патологии функциональное значение могут иметь как аллельные варианты, как правило, определяющие прогноз заболевания, так и генотипы. Полиморфность является одним из показателей генетической изменчивости популяций. Поэтому следующим этапом исследования стало определение полиморфизма гена TLR4 с установлением связей генотипа с характером микрофлоры и особенностями течения ХП у детей. Было показано, что частота гетерозиготного и гомозиготного мутантных генотипов AG и GG полиморфного локуса TLR4 у детей с ХП превышала таковую среди здоровых лиц ( $\chi^2=5,78$ ;  $p=0,023$ ). Выявлено достоверно более высокую частоту



**Анализ ассоциации генотипов TLR4 с этиологическими факторами ХП у детей**

ту мутантной аллели 299Gly среди детей с ХП, которая в 4,4 раза чаще встречалась в группе больных детей с ХП в отличие от здоровых лиц ( $\chi^2=5,78$ ;  $p=0,015$ ).

Выявленные данные определили потребность детального изучения ассоциации упомянутого выше полиморфизма с конкретными фенотипическими и этиопатогенетически значимыми признаками заболевания. При наличии мутантных вариантов гена TLR4 дети с обострением ХП имели выраженную лейкоцитирию, что практически в 30 раз превышала показатели детей без полиморфизма указанного гена и оставалась выше нормы на момент выписки из стационара ( $p<0,05$ ). Данная категория пациентов также имела более выраженные нарушения концентрационной и выделительной функции почек во время обострения ХП, а именно увеличение суточного диуреза ( $\chi^2=14,7$ ;  $p<0,001$ ), снижение относительной плотности мочи ( $\chi^2=3,5$ ;  $p<0,001$ ) и СКФ ( $\chi^2=15,1$ ;  $p<0,001$ ).

Установлено, что существуют ассоциации генотипов полиморфного локуса TLR4 не только с клинико-лабораторными данными детей с ХП, но и с характером микрофлоры. В частности, *M.hominis* и *U.urealyticum* практически в 6 и 12 раз чаще, соответственно, определяли у детей с мутантным распределением гена TLR4 (рисунок).

Обнаружено значимые взаимосвязи между присутствием 299Gly TLR4 и наличием ассоциации *U.urealyticum* и *M.hominis* ( $\tau=0,41$ ), а также с одновременным выявлением *E. coli* с *U.urealyticum* и *M.hominis* ( $\tau=0,58$ ). В то же время у детей с нормальным распределением данного гена преобладала бактериальная моноинфекция (42,55%), представленная в большинстве случаев *E.coli*, что не наблюдалось ни у одного пациента с мутацией TLR4.

Следует отметить, что достоверно большую частоту рецидивов наблюдали у детей-носителей мутантного гена 299Gly TLR4 (4,6±0,3 раза в год) в отличие от больных с нормальным распределением аллелей гена, частота обострений которых была практически в 3,5 раза меньше ( $\chi^2=5,6$ ;  $p=0,021$ ).

### ВЫВОДЫ

Таким образом, при обследовании больного хотя бы с одним эпизодом лейкоцитирии, следует в первую очередь определить степень риска хронизации ИМС. Для этого необходимо учитывать наиболее значимые предикторы, которые индуцируют реализацию хронического пиелонефрита. Применение статистической обработки катamnестических и анамнестических данных позволяет считать, что таковыми у детей являются: наследственная отягощенность по нефрологическим заболеваниям по материнской линии или двум родословным, патологическое течение беременности у матери, наличие TORCH-инфек-

ции и перенесенные матерью острые респираторные инфекции в ранние сроки беременности, дисбиоз кишечника у ребенка на первом году жизни, заболевания половой системы, пороки мочевыводящей системы и частые ОРВИ у ребенка.

При выявлении пациентов с высоким потенциальным риском реализации хронического течения ПН рекомендовано углубленное генетическое исследование. Выявление аллеля G гена TLR4 по результатам проведенных исследований свидетельствует о рецидивирующем течении хронического пиелонефрита

### Генетичні предиктори хронізації пієлонефриту у дітей

**Т.О. Крючко, В.П. Остапенко, А.В. Луканін**

У даний час проблема пієлонефриту вкрай важлива, оскільки під час лікування пацієнтів з даною нозологією лікарі різних спеціальностей стикаються з деякими труднощами. Одним із сучасних підходів у попередженні розвитку нефрологічної патології є генетичне прогнозування ризику її формування.

Мета нашого дослідження – з сучасних позицій оцінити значущість генетичних маркерів у реалізації хронічного пієлонефриту (ХП) в дитячому віці і проаналізувати їхні асоціації з характером мікрофлори і особливостями перебігу ХП у дітей.

Отримані результати підтверджують важливу роль Toll-подібних рецепторів у реалізації вродженої імунної відповіді і дозволяють розглядати поліморфізм гена Toll-подібного рецептора 4 в якості додаткового прогностичного показника в генетичних дослідженнях.

**Ключові слова:** вроджений імунітет, поліморфізм, Toll-подібні рецептори, внутрішньоклітинні збудники.

та у дітей со склонностью к устойчивой бактериурии и повышенной чувствительностью к основным внутриклеточным возбудителям (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*).

Внедрение генетического обследования является приоритетным направлением детской нефрологии, поскольку оно нацелено на раннее прогнозирование хронического рецидивирующего течения ПН и предоставляет возможность своевременного адекватного превентивного лечения, которое учитывает индивидуальные наследственные особенности организма больного ребенка.

### Genetic predictors of chronization of pyelonephritis at children

**T.A. Kryuchko, V.P. Ostapenko, A.V. Lukanin**

At present the problem of pyelonephritis is extremely important and diverse, as the treatment of patients with this nosology of complexity in the daily work of doctors of different specialties. One of the modern approaches to the prevention of nephrology pathology is genetic risk prediction of its formation. The aim of our study was to evaluate the significance of modern positions of genetic markers in the implementation of the propensity to chronic pyelonephritis in children and analyze their association with major etiological and clinical characteristics of the disease. The results confirm the important role of Toll-like receptors in innate immune responses implement and allow to consider gene polymorphism Toll-like receptor 4 as additional prognostic indicator in genetic studies.

**Key words:** innate immunity, polymorphism, Toll-like receptors, intracellular pathogens.

### Сведения об авторах

**Крючко Татьяна Александровна** – ВГУЗ «Украинская медицинская стоматологическая академия», 36040, г. Полтава, ул. Шевченко, 36; тел.: (0532) 60-64-91 (факс). E-mail: drkryuchko@gmail.com

**Остапенко Вера Петровна** – ВГУЗ «Украинская медицинская стоматологическая академия», 36040, г. Полтава, ул. Шевченко, 36; тел.: (0532) 60-64-91 (факс). E-mail: gold-ostap2@mail.ru

**Луканин Андрей Вячеславович** – ВГУЗ «Украинская медицинская стоматологическая академия», 36040, г. Полтава, ул. Шевченко, 36; тел.: (0532) 60-64-91 (факс). E-mail: 99mubay21@mail.ru

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медико-санітарна допомога хворим дітям нефрологічного профілю / В.В. Безруков, Ю.М. Нечитайло, Т.О. Безрук [та ін.] // Современная педиатрия. – 2011. – Т. 40, № 6. – С. 171–173.
2. Багдасарова И.В. Диагностика и прогнозирование течения инфекций мочевыводящей системы у детей / И.В. Багдасарова, О.В. Лавренчук, Л.А. Мигаль // Клиническая нефрология. – 2012. – № 4. – С. 68–70.
3. Інфекції сечових шляхів і нирок у практиці сімейного лікаря: [метод. рек.ком.] / Д.Д. Іванов, С.В. Кушніренко, Н.П. Мехатішвілі, Т.К. Резник. – К., 2006. – 20 с.
4. Майданник В.Г. Клінічна діагностика в педіатрії / В.Г. Майданник, О.В. Бутіліна. – К.: «Дорого-друж», 2012. – 286 с.
5. Вельков В.В. Современная лабораторная диагностика ренальных патологий: от ранних стадий до острой почечной недостаточности / В.В. Вельков, О.И. Резникова // Лабораторная диагностика. – 2010. – № 4 (54). – С. 59–65.
6. Детская нефрология: [руководство для врачей] / Э. Лойманн, А.Н. Цыгин, А.А. Саркисян; пер. с англ. Н. Ариканц, Н. Манукян. – М.: Литтерра, 2010. – 416 с.
7. Майданник В.Г. Роль Толл-подобных рецепторов в патологии почек / В.Г. Майданник // Здоровье Украины. – 2014. – № 6. – С. 20–22.
8. Особенности пиелонефрита у детей раннего возраста / П.Н. Марталог, М.П. Балануца, А.М. Гурагата [и др.] // Перинатология и педиатрия. – 2011. – Т. 46, № 2. – С. 107–109.
9. Абатуров А.Е. Инициация воспалительного процесса при вирусных заболеваниях, возможности и перспективы медикаментозного управления / А.Е. Абатуров, А.П. Волосовец, Е.И. Юлиш. – Х.: ООО«С.А.М.», 2011. – 392 с.
10. Абатуров А.Е. Молекулярный щит респираторного тракта от грамотрицательных бактериальных агентов / А.Е. Абатуров // Здоровье ребенка. – 2009. – № 6. – С. 124–129.
11. Ізмайлова І.В. Дослідження поліморфізмів генів TLR2 ARG753GLN та TLR4 ASP299GLY, THR399ILE при уrogenітальних інфекціях / І.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, І.П. Кайдашев // Журнал АМН України. – 2010. – Т. 16 (додаток). – С. 72–73.
12. Роль поліморфізму Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом / О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, Н.О. Боброва [та ін.] // Проблеми екології та медицини. – 2009. – Т. 13, № 5–6. – С. 3–6.
13. Лебедев К.А. Иммунология об-разраспознающих рецепторов / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина. – М.: ЛИБРОКОМ, 2008. – 253 с.
14. The Kelalis-King-Belman Textbook of Clinical Pediatric Urology / [ed.-in-chief S.G. Docimo]. – [5th ed.]. – London: Informa Healthcare UK Ltd, 2007. – 1396 p.
15. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphism and expression with urinary tract infection types in adults / X. Yin, T. Hou, Y. Liu [et al.] // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 12. – P. 14223.
16. Simon J. Interpreting the estimated glomerular filtration rate in primary care: benefits and pitfalls / J. Simon, M. Amde, E.D. Poggio // Clev. Clin. J. Med. – 2011. – Vol. 78, № 3. – P. 189–195.
17. Kryuchko T.O. New look at the etiology of chronic pyelonephritis among children with polymorphism of TLR2 gene (Новий погляд на етіологію хронічного пієлонефриту у дітей з урахуванням поліморфізму гена TLR2) / Т.О. Крючко, В.П. Остапенко, І.П. Кайдашев // Педиатрия. Восточная Европа. – 2013. – № 3 (03). – С. 82–88.
18. Kryuchko T.O. Genetic polymorphism of Toll-like receptor 4 – predictor of susceptibility to recurrent course pyelonephritis among children (Поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 – предиктор схильності до рецидивуючого перебігу хронічного пієлонефриту у дітей) / Т.О. Крючко, В.П. Остапенко, Т.В. Кущнерова // Здоровье ребенка. – 2013. – № 7 (50) – С. 13–19.
19. Hasebe A. Partial purification of the active entities in the cultural supernatant of *Mycoplasma fermentans* that induce interleukin-6 production by human gingival fibroblasts / A. Hasebe, K. Shibata, L. Dong et al. // Abst. 13th Int. Cong. of 10 M Fukuoka, Japan. – 2000. – P. 169.

Статья поступила в редакцию 04.02.2015