

УДК 616.34:616-053.4/5

МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА, БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА**Колесов С.А., Жукова Е.А., Коркоташвили Л.В., Федулова Э.Н., Тутина О.А., Толкачева Н.И.***ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт детской гастроэнтерологии»
Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, e-mail sakdom2@gmail.com*

У детей с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) оценена концентрация в крови ряда веществ, играющих важную роль в аутоиммунном процессе, феномене воспаления: общих метаболитов оксида азота (NOx), s-нитрозотиолов (RSNO), белка теплового шока 70 (БТШ70) и провоспалительных цитокинов (ПЦ). Результаты определения концентраций всех исследованных агентов свидетельствуют о том, что выраженность активности иммунопатологического процесса и воспаления выше у детей при язвенном колите (ЯК). Определение концентрации NOx, RSNO, БТШ70 в крови детей с ЯК и болезнью Крона (БК) может быть использовано для оценки их состояния. Полученные данные дополняют представления о патогенезе ВЗК.

Ключевые слова: оксид азота, s-нитрозотиолы, белок теплового шока 70, воспалительные заболевания кишечника, дети

NITRIC OXIDE METABOLITES, HEAT SHOCK PROTEIN 70, PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**Kolesov S.A., Zhukova E.A., Korkotashvili L.V., Fedulova E.N., Tutina O.A.***Nizhny Novgorod Federal Research Institute of Pediatric Gastroenterology, Nizhny Novgorod,
e-mail sakdom2@gmail.ru*

In blood of children with bowel inflammatory diseases (IBD) we assessed the concentration of some substances, which play a key role in an autoimmune process, an inflammation phenomenon: nitric oxide metabolites (NOx), S-nitrosothiols (RSNO), heat shock protein70 (HSP70), and proinflammatory cytokines (PIC). The data on determined concentration of agents under study show the intensity of immunopathological process activity and inflammation to be higher in children with ulcerative colitis (UC). The determination of NOx, RSNO, HSP70 concentrations in blood of children with UC and Crohn's disease (CD) can be used to assess their condition. The findings complete the concept of IBD pathogenesis.

Keywords: nitric oxide, s-nitrosothiols, heat shock protein70, inflammatory bowel diseases, children

ВЗК являются хроническими рецидивирующими заболеваниями к которым относятся такие нозологические формы, как НЯК и БК.

Патогенез ВЗК окончательно не выяснен, но его основой считается иммунопатологический процесс, выражающийся в перманентном воспалении слизистой толстой кишки или разных отделов пищеварительного тракта. Существенную роль в нем отводят оксиду азота (NO), белкам теплового шока и ПЦ [3, 4, 7, 10]. К настоящему времени отсутствуют опубликованные работы, в которых изложены результаты исследований этих веществ у детей с ВЗК.

Цель исследования. Целью исследования явилась оценка содержания в сыворотках крови детей, больных ВЗК, ряда веществ, важных для аутоиммунного процесса, феномена воспаления и, следовательно, патогенеза ВЗК: NOx, RSNO, внеклеточного БТШ70 и ПЦ.

Материалы и методы исследования

На проведение исследования было получено разрешение этического комитета. От всех родителей детей (или самих детей старше 14 лет) получено информированное согласие на участие в исследовании. Всего в него были включены 130 детей обоих полов, в том числе 111 пациентов в возрасте от 6 до 17 лет (средний возраст – 14 лет), страдающих ВЗК (67 детей с ЯК и 44 ребенка с БК); 19 условно-здоровых детей с аналогичными половыми и возрастными характеристиками составили группу сравнения. Кровь для проведения исследований получали утром, натощак, путем венепункции локтевой вены. Получение сывороток осуществлялось стандартным методом.

Индубильный БТШ70 в образцах сывороток крови определяли с использованием тест-системы «Hsp70 High Sensitivity EIA Kit» (производства Stressgen Bioreagents). NOx и RSNO определялись с помощью модификаций метода Грисса [5,9]. ПЦ выявляли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем, производства ООО «Протеиновый контур» (Россия, СПб).

Полученные данные подвергнуты статистической обработке при помощи пакета прикладных статистических программ «STATISTICA 6.1» (StatSoft®).

США). С помощью критерия Колмогорова не удалось выявить нормальности в распределении полученных данных, поэтому вычислялись медиана, средняя величина, минимальное и максимальное значения; достоверность различий оценивалась при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни; коэффициент корреляции рассчитывали по Спирмену.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные о содержании в исследованных сыворотках крови NOx и RSNO представлены в табл. 1.

Таблица 1
Статистические показатели содержания NOx (мкМ) и RSNO (нМ/мл) в сыворотках крови у детей с ВЗК

Статистические показатели	Условно-здоровые дети		Дети с заболеваниями			
	NOx	RSNO	БК		ЯК	
			NOx	RSNO	NOx	RSNO
Численность выборки	19	19	45	45	67	67
Минимум	7,71	20,00	10,90	60,00	11,50	60,00
Максимум	48,25	260,00	105,90	440,00	257,20	1260,00
Средняя	26,45	159,38	51,40	237,50	74,56	299,20
Медиана	25,68	140,00	46,40	220,00	62,70	240,00
P (в сравнении со здоровыми)	-	-	0,005	0,000	0,000	0,000

К настоящему времени имеются многочисленные научные работы, свидетельствующие о том, что NO крайне важен для функционирования организма, как в норме, так и при патологии [3,6,8]. Вырабатываемый в организме NO, обладающий коротким периодом жизни и высокой химической активностью, способен запасаться в виде нитрозосоединений, к которым относят RSNO [2]. Большая продолжительность жизни RSNO в биологических системах предполагает их доминирующую роль в качестве посредника биологической активности NO, однако эти соединения изучены в гораздо меньшей степени. Тем не менее известно, что RSNO играют ключевую роль как в здоровье человека, так и при заболеваниях [8].

Полученные нами данные указывают на то, что изменения содержания RSNO в сыворотке крови у детей с ВЗК согласуются с данными литературы о наномолярном физиологическом уровне RSNO [8,9]. Однако, в отличие от NOx средние величины RSNO в сыворотках крови пациентов с ЯК и БК статистически неотличимы (медианы в исследуемых группах составляют 240,00 и 220,00 нМ/мл соответственно). Одновременно с тем, в обеих исследованных группах медианы значения RSNO го-

раздо выше, чем у здоровых детей и отличаются с высокой степенью достоверности (550% и 600% соответственно). Необходимо так же отметить тенденцию к большим значениям концентрации RSNO в сыворотках крови детей, больных ЯК.

К настоящему времени известно, что абберантная активность синтаз NO характерна для многих заболеваний ЖКТ, но практически ничего не известно о том, транслируется ли она в измененную активность RSNO и каковы механизмы этой трансляции [8]. Поэтому нами был произведен корреляционный анализ, с помощью которого исследована взаимозависимость между содержанием в сыворотках крови детей NOx и RSNO. Проведенные расчеты показали, что коэффициент корреляции по Спирмену между этими показателями для ЯК составил -0,060, а для БК – 0,178. Полученные данные свидетельствуют о том, что прямые взаимосвязи между исследуемыми биохимическими веществами при БК и ЯК отсутствуют. Результаты подтверждают мнение, что механизмы образования RSNO сложны и к настоящему времени неизвестны.

Данные о содержании в исследуемых сыворотках крови БТШ70 представлены в табл. 2.

Таблица 2

Содержание БТШ70 (пг/мл) в сыворотках крови детей с ВЗК

Статистические показатели:	Условно-здоровые дети	Заболевания	
		БК	ЯК
Численность выборки	19	45	67
Минимум	98,40	191,00	300,00
Максимум	265,00	3105,00	1945,00
Средняя	136,40	697,79	1541,55
Медиана	125,60	670,00	760,00
p (в сравнении со здоровыми)	-	0,000	0,000

Представленные в таблице данные убедительно указывают на то, что концентрация БТШ70 в сыворотке крови детей, страдающих ВЗК, существенно повышена: медиана их содержания БТШ70 при БК превышает аналогичный уровень в группе здоровых в 5 раз. Значения БТШ70 при ЯК в 6 раз выше показателей в группе сравнения.

БТШ70 относят к стресс-белкам или белкам теплового шока, которые необычайно важны, поскольку обеспечивают защиту от стресса. Функции внеклеточного БТШ70 в настоящее время интенсивно изучаются. Выяснено, что одной из них является иммуномодуляторная, кроме того, БТШ70 участвует в воспалительном процессе, в том числе и посредством ингибирования плюрипотентного транскрипционного фактора NF-kB [1].

Несмотря на несомненную важность для организма, свойства внеклеточного БТШ 70 исследовались в педиатрической практике явно недостаточно, а его исследования при ВЗК у детей отсутствуют вовсе.

В настоящее время нет единой точки зрения на роль БТШ70 в патогенезе ВЗК

у взрослых. Кроме того, результаты крайне немногочисленных опубликованных работ основаны на исследованиях внутриклеточного БТШ70. Поэтому данные о содержании экстрацеллюлярного БТШ70 в сыворотке крови детей с ВЗК, полученные в ходе настоящего исследования, могут иметь существенный интерес.

Данные наших исследований позволяют сделать предположение о том, что концентрация внутриклеточного и внеклеточного БТШ70 у детей при ВЗК взаимосвязаны и содержание БТШ70 в сыворотке определяется как степенью повышения его концентрации в кишечном эпителии, так и особенностями выхода в кровь (по всей видимости выраженностью воспалительного процесса и цитолиза).

Таким образом, увеличение содержания исследованных веществ в сыворотках детей с ВЗК мы склонны рассматривать прежде всего как следствие воспалительного процесса. Подтверждение подобному предположению может дать исследование концентрации в крови ПЦ – ИЛ-1β и ФНО-α, которые принято рассматривать в качестве маркеров воспалительного процесса (табл. 3).

Таблица 3

Содержание ИЛ-1β (пг/мл) и ФНО-α (пг/мл) в сыворотках крови детей с ВЗК

Статистические показатели:	Условно-здоровые дети		Дети с заболеваниями:			
			БК		ЯК	
	ИЛ-1β	ФНО-α	ИЛ-1β	ФНО-α	ИЛ-1β	ФНО-α
Численность выборки	19	19	44	44	67	67
Минимум	10,70	4,50	8,50	8,60	7,60	9,90
Максимум	45,30	51,60	775,50	1366,00	2052,20	2091,80
Средняя	22,5	23,5	154,00	152,30	384,70	269,20
Медиана	19,60	20,30	52,10	59,50	91,25	121,65
P (в сравнении со здоровыми)	-	-	0,000	0,000	0,000	0,000

Получено, что содержание обоих ПЦ при ВЗК у детей значительно повышено: медиана значений ИЛ-1 β при ЯК в сыворотке крови составляет 465% (относительно уровня в крови здоровых детей), при БК она соответствует 266%, а ФНО- α равняется соответственно 599% и 293%.

Представленные результаты вполне сопоставимы с данными, полученными в экспериментальных работах на животных, свидетельствующими, что NO x , RSNO, БТШ70 и ПЦ взаимосвязаны и образуют целую систему, помогающую регулировать гомеостаз как в состоянии здоровья, так и при патологическом воспалительном процессе [4].

Заключение

Результаты определения концентраций всех исследованных агентов свидетельствуют о том, что выраженность активности иммунопатологического процесса и воспаления выше у детей с ЯК, чем с БК. Определение концентрации NO x , RSNO, БТШ70 в крови при обоих заболеваниях может быть использовано для оценки состояния пациентов. Полученные данные дополняют представления о патогенезе ВЗК.

Список литературы

1. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции // Цитология. – 2009. – № 2. – С. 130 – 137.
2. Колесов С.А., Коркоташвили Л.В., Языкова А.Б., Федулова Э.Н., Видманова Т.А. S-нитрозотиолы и оксид азота при хронических гастроэнтерологических заболеваниях у детей // Врач-аспирант. – 2012. – № 3,3(52). – С. 471 – 479
3. Коркоташвили Л.В., Романова С.В., Колесов С.А. Оксид азота, его метаболиты и система глутатиона у детей с хроническим вирусным гепатитом В и С // Вестник РАМН. – 2013. – 10. – С. 32 – 36
4. Кустанова Г.А., Евгеньев М.Б., Карпов В.Л., Маргулис Б.А., Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Мурашев А.Н. Влияние экзогенного белка теплового шока 70 кДа на биохимические параметры крыс Wistar при эндотоксическом шоке // Доклады Академии наук. – 2007. – № 1. – С. 125– 28.
5. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клини. лаб. диагн. – 2005. – № 6. – С. 15–18.
6. Рахманов Р.С., Трошин В.В., Блинова Т.В., Страхова Л.А. Коррекция иммунодефицитного состояния и антиоксидантного статуса при значительных физических нагрузках продуктами с повышенным содержанием биологически активных веществ // Медицинский альманах. – 2012. – № 3 (22). – С.156 – 158.
7. Языкова А.Б., Коркоташвили Л.В., Колесов С.А., Федулова Э.Н., Федорова О.В. Применение математического и статистического подхода при изучении отдельных метаболитов у детей с воспалительными заболеваниями кишечника: построение модели полиномиальной регрессии // Врач-аспирант. – 2012. – № 3,4(52). – С. 563 – 571.
8. Kolesov S.A., Korkotashvili L.V., Yazykova A.B., Fedulova E.N., Tutina O.A., Tolkacheva N.I. Levels of S-nitrosothiols, nitric oxide metabolites and proinflammatory cytokines in blood serum in children with inflammatory bowel disease // Clinical Laboratory. – 2013. – № 9+10. – P.953 – 957.
9. Kubes P, Payne D., Grisham MB, Jourd-Heuil D., Fox-Robichaud A. Inhaled NO impacts vascular but not extravascular compartments in postischemic peripheral organs // Am J Physiol. – 1999. – № 277(2 Pt 2). – P. 676 – 82.
10. Thoreson R., Cullen J.J. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview // Surg Clin North Am. – 2007. – № 87(3). – P. 575 – 85.