

Wskaźniki włóknienia nerek u leczonych zachowawczo dzieci z przewlekłą chorobą nerek

Kinga Musiał, Danuta Zwolińska

Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej, Wrocławski Uniwersytet Medyczny

Musiał K, Zwolińska D. Wskaźniki włóknienia nerek u leczonych zachowawczo dzieci z przewlekłą chorobą nerek. Med Og Nauk Zdr. 2013; 19(1): 41–44.

Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy: Metaloproteinazy (MMP), ich tkankowe inhibitory (TIMP), molekuly adhezyjne i białka szoku cieplnego (hsp) mogą odgrywać zasadniczą rolę w procesie włóknienia śródmiąższu nerek, ale dane dotyczące takich zależności w przewlekłej chorobie nerek (PChN) są skąpe. Celem pracy była ocena stężeń Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u dzieci z PChN w okresie predializacyjnym oraz potencjalnych związków pomiędzy tymi parametrami.

Materiał i metody: Badaniami objęto 39 dzieci z przewlekłą chorobą nerek w stadium 3–4. (PChN I) i 26 pacjentów w stadium 5. leczonych zachowawczo (PChN II). Grupę kontrolną stanowiło 30 dzieci z pierwotnym moczeniem nocnym i prawidłową funkcją nerek. U wszystkich badanych oznaczono surowicze stężenia Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 z zastosowaniem metody ELISA.

Wyniki: Mediany stężeń Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 były znacznie podwyższone w obu grupach chorych w stosunku do grupy kontrolnej. Wartości rosły wraz z progresją PChN w przypadku sE-selektyny i MMP-2, podczas gdy TIMP-1 i TIMP-2 pozostały bez zmian, a stężenia Hsp90 α uległy obniżeniu. Wykazano szereg korelacji pomiędzy badanymi parametrami.

Wnioski: Podwyższone stężenia Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u dzieci z PChN przemawiają za wzmożonym uszkodzeniem komórek oraz nasileniem procesów zapalnych i proteolitycznych, odpowiedzialnych za postępujące włóknienie miąższu nerek. Różnice w zachowaniu poszczególnych parametrów podczas progresji niewydolności nerek wskazują na dywersyfikację zaangażowania poszczególnych składowych w zależności od stadium PChN.

Słowa kluczowe

Hsp90 α , sE-selektyna, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2

WSTĘP

Obraz histopatologiczny zaawansowanych stadiów przewlekłej choroby nerek jest niezależny od pierwotnej przyczyny PChN i obejmuje szkliwienie kłębuszków nerkowych, zanik cewek nerkowych oraz włóknienie śródmiąższu. Niekwestionowaną rolę w tym procesie pełni kumulacja macierzy zewnątrzkomórkowej, będąca wynikiem braku równowagi między jej produkcją a degradacją. Za powyższe zaburzenia odpowiadają m.in. liczne proteazy, w tym metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) i ich inhibitory (TIMP) [1, 2].

Mechanizmem o zasadniczym znaczeniu dla powyższych procesów jest przewlekły stan zapalny, generujący włóknienie, jako odpowiedź na uszkodzenie komórek w obrębie miąższu nerkowego [3]. Aktywacji ulegają monocyty, a wskutek wzmożonej ekspresji molekuł adhezyjnych wzrasta ich mobilność i zdolność przylegania do śródbłonek naczyń [4]. Pobudzenie *endothelium*, którego wyznacznikiem jest m.in. aktywność E-selektyny, ułatwia diapedezę monocytów i ich kumulację w miejscu zapalenia. Tam, pod wpływem substancji uwalnianych z uszkodzonych komórek, podlegają one różnicowaniu *in situ* w makrofagi, które promują dalszy postęp destrukcji tkanek [5].

Kumulacja makrofagów i wzrost aktywności uwalnianych przez nie enzymów proteolitycznych stymulują w pierwszej fazie eliminację uszkodzonych komórek, zapobiegając nad-

miernemu rozrostowi składników macierzy zewnątrzkomórkowej [6]. Jednak, gdy dojdzie do zaburzenia równowagi pomiędzy substancjami uszkadzającymi a naprawczymi a niekorzyść tych ostatnich, rozpoczyna się nieodwracalny proces, którego efektem jest zwłóknienie miąższu i niewydolność nerek.

Niekorzystny przebieg powyższych procesów skłania do poszukiwań substancji mogących zahamować progresję włóknienia. Wstępne wyniki badań *in vitro* i eksperymentów na zwierzętach wskazują na możliwość spowolnienia tego procesu. Udowodniono to hamując działanie wybranych metaloproteinaz (MMP-2) i białek szoku cieplnego (Hsp90) [7, 8]. Brak jest jednak doniesień na temat roli tych czynników w procesie włóknienia śródmiąższu nerek u chorych z PChN, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena surowiczych stężeń Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u dzieci z przewlekłą chorobą nerek w okresie predializacyjnym oraz ich wzajemnych korelacji i potencjalnego udziału w procesie włóknienia w przebiegu PChN.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 95 pacjentów. Ich charakterystykę przedstawiono w Tabeli 1.

Adres do korespondencji: Kinga Musiał, Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej, Wrocławski Uniwersytet Medyczny, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
e-mail: kinga_musial@hotmail.com

Nadesłano: 25 stycznia 2013; zaakceptowano do druku: 4 marca 2013

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów

Parametr	Mediany (dolny – górny kwartył) analizowanych parametrów		
	Gr. kontrolna (n = 30)	PChN I (n = 39)	PChN II (n = 26)
wiek [lata]	10.0 (5.5-15.5)	9.0 (4.5-14.5)	10.5 (2.0 – 16.5)
płeć	16 dziewcząt 14 chłopców	18 dziewcząt 21 chłopców	10 dziewcząt 16 chłopców
eGFR [ml/min]	101.0 (97.0-110.0)	36.2 (24.3-41.3)	13.0 (10.6-14.8)

Pierwszą grupę (PChN I) stanowiło 39 dzieci z przewlekłą chorobą nerek w stadium 3–4. Wśród przyczyn PChN wyróżniono: nefropatię refluksową (16), przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (12), przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek (5), torbielowatość nerek (4), zespół hemolityczno-mocznicowy (1) i wrodzony zespół nerczycowy (1).

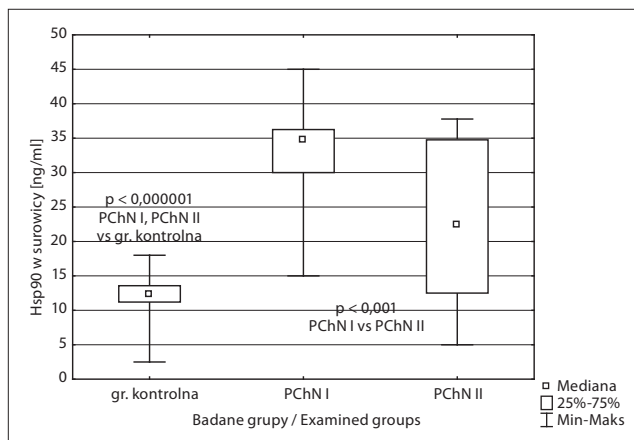
Druga grupa (PChN II) obejmowała 26 pacjentów z PChN w stadium 5. Pierwotnymi przyczynami PChN były: nefropatia refluksowa (13), przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (9), pęcherz neurogeny (3) i zespół hemolityczno-mocznicowy (1).

Grupę kontrolną stanowiło 30 dzieci diagnozowanych z powodu pierwotnego moczenia nocnego, z prawidłową funkcją nerek. U żadnego z pacjentów nie stwierdzono cech infekcji, żadne dziecko nie otrzymywało antybiotyków ani leków immunosupresyjnych.

Krew pobierano na czczo przy wykonywaniu rutynowych badań kontrolnych. Po wykrzepieniu w temperaturze pokojowej (przez co najmniej 30 minut) wirowano materiał (1000g przez 10 minut), a uzyskaną surowicę przechowywano w temp. -20°C . Stężenia Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 zostały oznaczone testem ELISA przy użyciu komercyjnych zestawów (R&D Systems, Stressgen). Wielkość filtracji kłębuszkowej (GFR – glomerular filtration rate) wyliczono wg zmodyfikowanego wzoru Schwartz'a [9].

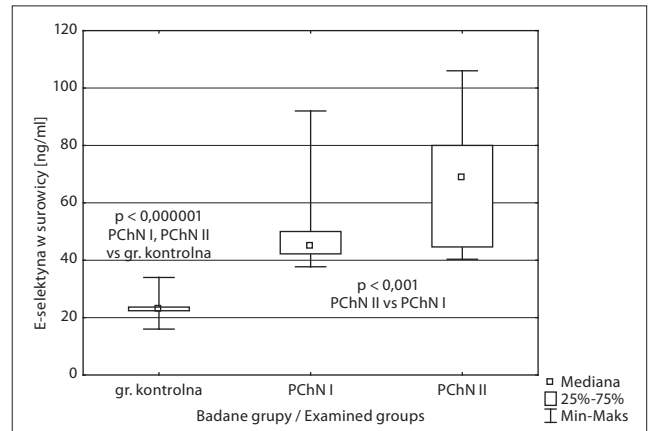
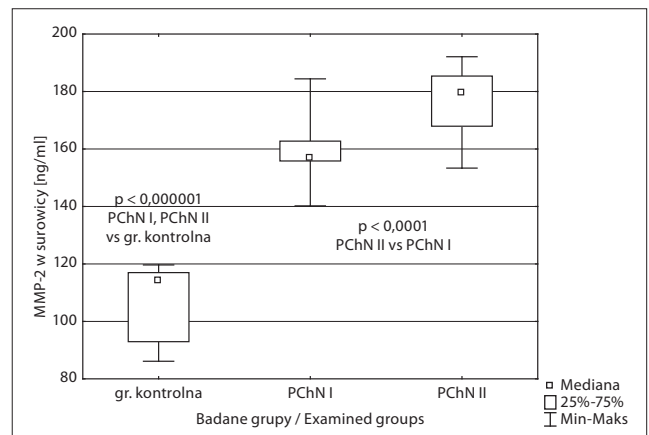
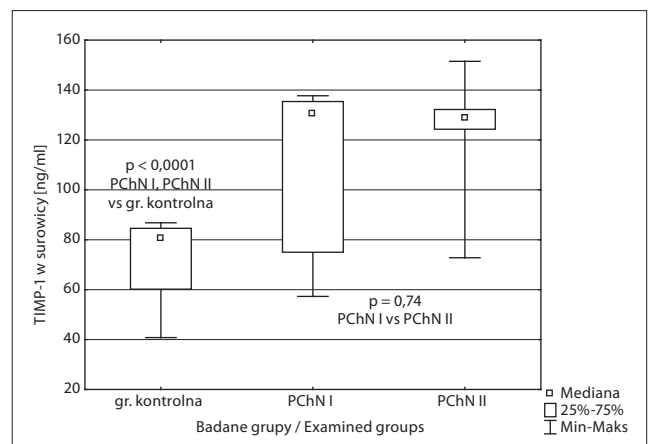
Analiza statystyczna

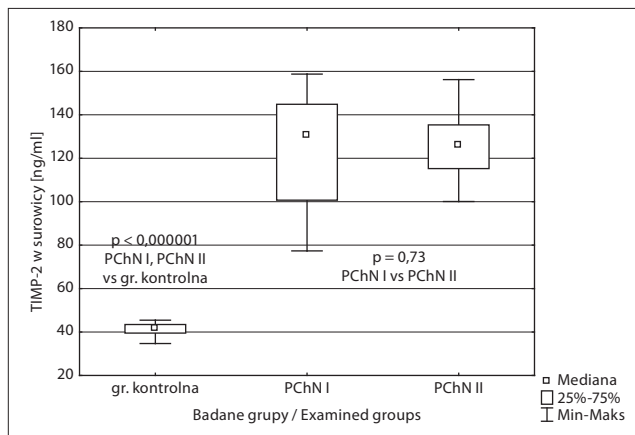
Dane dotyczące poszczególnych parametrów podano w postaci mediany, dolnego i górnego kwartyła. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testów nieparametrycznych (Kruskalla-Wallisa, U Manna-Whitney'a) z wykorzystaniem pakietu Statistica 10.0 (StatSoft). W badaniach korelacyjnych wykorzystano współczynnik korelacji Pearsona. Za wartość istotną statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

**Rycina 1.** Stężenia Hsp90 w surowicach pacjentów z PChN i w grupie kontrolnej

WYNIKI

Mediany stężeń Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u pacjentów z PChN w obu grupach były istotnie wyższe od obserwowanych w grupie dzieci zdrowych (Ryc. 1–5). Wartości sE-selektyny i MMP-2 u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek były znacząco wyższe niż u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek (Ryc. 2–3), stężenia TIMP-1 i TIMP-2 nie zmieniły się (ryc.4–5). Wartości Hsp90 α uległy istotnemu obniżeniu wraz z progresją PChN, chociaż pozostały wyższe od stwierdzanych w grupie kontrolnej (Ryc. 1).

**Rycina 2.** Stężenia E-selektyny w surowicach pacjentów z PChN i w grupie kontrolnej**Rycina 3.** Stężenia MMP-2 w surowicach pacjentów z PChN i w grupie kontrolnej**Rycina 4.** Stężenia TIMP-1 w surowicach pacjentów z PChN i w grupie kontrolnej



Rycina 5. Stężenia TIMP-2 w surowicach pacjentów z PChN i w grupie kontrolnej

Wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy Hsp90 α , sE-selektyną a badanymi metaloproteinazami oraz GFR (tab. 2).

Tabela 2. Współczynniki korelacji r Pearsona między badanymi parametrami u chorych z PChN na poziomie istotności < 0.05

Badane parametry	Hsp90 α w sur.	sE-selektyna	GFR (glomerular filtration rate)
Hsp90 α w sur.	-	r = -0.73 p < 0.000001	r = 0.40 p < 0.001
sE-selektyna w sur.	r = -0.73 p < 0.000001	-	r = -0.37 p < 0.001
MMP-2 w sur.	r = -0.48 p < 0.0001	r = 0.50 p < 0.0001	r = -0.52 p < 0.0001
TIMP-1 w sur.	r = 0.42 p < 0.001	r = -0.43 p < 0.001	r = 0.09 p = 0.58
TIMP-2 w sur.	r = 0.54 p < 0.0001	r = -0.42 p < 0.001	r = 0.07 p = 0.67

OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały zmienność stężeń Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u dzieci w różnych stadiach przewlekłej choroby nerek oraz istnienie korelacji pomiędzy badanymi parametrami, wskazujących na rolę tych parametrów w procesie włóknienia.

W grupie dzieci z PChN stężenia MMP-2 były znacząco wyższe niż w grupie kontrolnej, rosły wraz z progresją niewydolności nerek i korelowały ujemnie z GFR. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi podwyższonych stężeń enzymu u chorych z PChN [10]. W badaniach na zwierzętach udowodniono profibrotyczne działanie MMP-2 [2]. Wzrost stężeń mógłby więc być wyznacznikiem nasilającego się włóknienia w zaawansowanych stadiach PChN. Jednak zastanawiające jest utrzymywanie się wysokich wartości MMP-2 nawet w schyłkowej niewydolności nerek, kiedy proces włóknienia jest już praktycznie zakończony. Wy tłumaczeniem takiego stanu rzeczy może być zależność efektu działania MMP-2 od stopnia zaawansowania zmian w nerce. W badaniach na zwierzętach wykazano, że zahamowanie aktywności enzymu na etapie wczesnych zmian fibrotycznych w przeszczepionej nerce skutkowało ich wycofaniem, ale interwencja w późnym okresie powodowała paradoksalne nasilenie włóknienia [11]. Jest to prawdopodobnie uwarunkowane bezpośrednim

wpływem, jaki MMP-2 wywiera na makrofagi, zwiększając ich infiltrację w śródmiąszu nerkowym [12]. Początkowo zapobiega ona włóknieniu, ponieważ elementy macierzy podlegają fagocytozie, ale w miarę nasilania kumulacji produktów przemiany fibrynogenu ten mechanizm obronny staje się nieskuteczny. Należy jednak podkreślić, że wszystkie modele zwierzęce uwzględniają progresję włóknienia w perspektywie dni i tygodni, więc porównanie wczesnej i późnej fazy w tych eksperymentach z wieloletnią progresją PChN nie daje jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o rolę MMP-2 w tak długim przedziale czasowym.

Odmienne zachowywały się inhibitory metaloproteinaz, TIMP-1 i TIMP-2, których stężenia były w obu grupach PChN podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej, ale nie wykazywały różnic pomiędzy zaawansowaną i schyłkową niewydolnością nerek. Udowodniono, że TIMP-1 i TIMP-2 sprzyjają włóknieniu [1], co sugerowałoby sprzeczność działań, bo enzym i jego inhibitor wywierałyby taki sam, profibrotyczny, wpływ na śródmiąsz nerek. Jednak, podobnie jak w przypadku MMP-2, aktywność inhibitorów wydaje się pozostawać w ścisłym związku z progresją niewydolności nerek. Stężenia TIMP-1 w przebiegu PChN zaczynają narastać dopiero w jej zaawansowanych stadiach, są więc prawdopodobnie odpowiedzią na wzmogoną aktywność metaloproteinaz [10]. W przypadku progresji włóknienia, osiągnięcie przez TIMP-1 i TIMP-2 fazy plateau w schyłkowej niewydolności nerek oznaczałoby dostosowanie do mniejszej efektywności MMP-2 – wzrost osłabiałby dodatkowo wpływ, i tak już nieskutecznej, MMP-2.

Stężenia sE-selektyny u dzieci z PChN wzrastały proporcjonalnie do pogarszającej się wydolności nerek i korelowały ujemnie z GFR, analogicznie do MMP-2. Ta zbieżność może wynikać z faktu, że sE-selektyna jest wyznacznikiem pobudzenia śródbłonna i jego zwiększonej przepuszczalności dla monocytów, podlegających diapedezie, migracji w kierunku ognisk zapalnych i przemianie w makrofagi. Zwiększone stężenia mogłyby więc być wskaźnikiem nasilonej aktywności komórek zapalnych, a tym samym mechanizmów obronnych zapobiegających włóknieniu. Tę teorię potwierdzałyby istnienie dodatniej korelacji między MMP-2 a sE-selektyną. Jednak wobec braku innych doniesień na temat roli tej cząsteczki adhezyjnej w procesie włóknienia, konieczna jest weryfikacja tej hipotezy na podstawie badań przeprowadzonych na większej grupie pacjentów. Nie można również wykluczyć znaczącego udziału kumulacji cząsteczki, na który wskazuje ujemna korelacja z GFR.

Jedynym wyjątkiem spośród badanych parametrów okazało się Hsp90 α , którego stężenia, chociaż wyższe w populacji PChN niż w grupie kontrolnej, malały wraz z progresją choroby. Białka szoku cieplnego stanowią ważny element nieswoistej odpowiedzi immunologicznej [13]. Są uwalniane pod wpływem stresu z uszkodzonych komórek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie wiążą się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek prezentujących antygen (antigen presenting cells – APC). Stymulują te komórki do produkcji cytokin i nasilają ekspresję cząsteczek adhezyjnych (m.in. E-selektyny) na komórkach śródbłonna [14]. Hsp należą także do kategorii wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMP – damage-associated molecular pattern) i mogą pełnić rolę sygnałów ostrzegawczych (ang. danger signals), informujących o dokonanym uszkodzeniu tkanek [15]. Dlatego wydają się idealnymi kandydatami do oceny stopnia nasilenia uszkodzenia komórek, do którego

dochodzi podczas włóknienia tkanek. Niedawno odkryto w badaniach *in vitro*, że hamowanie aktywności Hsp90 α zmniejsza nasilenie włóknienia w przebiegu PChN [8]. To potencjalnie profibrotyczne działanie Hsp90 α znalazło odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach. Jednocześnie obniżenie stężeń Hsp90 α w schyłkowej niewydolności nerek potwierdzałoby mniejsze nasilenie stanu zapalnego i uszkodzenia komórek na rzecz nieodwracalnej kumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Dodatkowym argumentem przemawiającym za przydatnością Hsp90 α jako markera aktywności procesu włóknienia jest obecność istotnych statystycznie korelacji z sE-selektyną i MMP-2.

WNIOSKI

Podwyższone stężenia Hsp90 α , sE-selektyny, MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2 u dzieci z przewlekłą chorobą nerek są wyrazem wzmożonego uszkodzenia komórek oraz nasilenia procesów zapalnych i proteolitycznych, odpowiedzialnych za postępujące włóknienie w obrębie mięszu nerek.

Różnice w zachowaniu poszczególnych parametrów podczas progresji niewydolności nerek wskazują na dywersyfikację zaangażowania poszczególnych składowych w zależności od stadium PChN.

Obecność korelacji pomiędzy badanymi markerami świadczy o złożoności procesu włóknienia i mnogości czynników, mających wpływ na jego przebieg.

PIŚMIENICTWO

1. Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP-1 and TIMP-2 in obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med.* 1995; 125(6): 754–761.

2. Imura O, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y, Kusano E. Effect of ureteral obstruction on matrix metalloproteinase-2 in rat renal cortex. *Clin Exp Nephrol.* 2004; 8(3): 223–229.
3. Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res.* 2012; 347(1): 141–154.
4. Musiał K, Zwolińska D, Polak-Jonkisz D, Berny U, Szprynger K, Szczepańska M. Serum VCAM-1, ICAM-1 and L-selectin levels in children and young adults with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20(1): 52–55.
5. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12): 958–969.
6. Sean Eardley K, Cockwell P. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int.* 2005; 68(2): 437–455.
7. Du X, Shimizu A, Masuda Y, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Uchiyama M, Kaneko T, Akimoto T, Iino Y, Fukuda Y. Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of renal interstitial fibrosis in mouse obstructive nephropathy. *Lab Invest.* 2012; 92(8): 1149–1160.
8. Noh H, Kim HJ, Yu MR, Kim WY, Kim J, Ryu JH, Kwon SH, Jeon JS, Han DC, Ziyadeh F. Heat shock protein 90 inhibitor attenuates renal fibrosis through degradation of transforming growth factor- β type II receptor. *Lab Invest.* 2012; 92(11): 1583–1596.
9. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, Furth SL. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(3): 629–637.
10. Musiał K, Zwolińska D. Matrix metalloproteinases (MMP-2,9) and their tissue inhibitors (TIMP-1,2) as novel markers of stress response and atherogenesis in children with chronic kidney disease (CKD) on conservative treatment. *Cell Stress Chaperones* 2011; 16(1): 97–103.
11. Lutz J, Yao Y, Song E, Antus B, Hamar P, Liu S, Heemann U. Inhibition of matrix metalloproteinases during chronic allograft nephropathy in rats. *Transplantation* 2005; 79(6): 655–661.
12. Nishida M, Okumura Y, Ozawa S, Shiraishi I, Itoi T, Hamaoka K. MMP-2 inhibition reduces renal macrophage infiltration with increased fibrosis in UO. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354(1): 133–139.
13. Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun.* 2010; 2(3): 238–247.
14. Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 395–425.
15. Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22(3): 416–425.

Indicators of renal fibrosis in children receiving conservative treatment for chronic kidney disease

Abstract

Background and Objective. Matrix metalloproteinases (MMPs), their tissue inhibitors (TIMPs), adhesion molecules and heat shock proteins (hsp) may play an essential role in the process of renal fibrosis, but the data concerning such influence in the patients with chronic kidney disease (CKD) on conservative treatment are scarce. The objective of the study was to assess the concentrations of Hsp90 α , sE-selectin, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in the predialysis CKD children and potential relations between these parameters.

Material and methods. 65 children were enrolled in the study and divided into those with CKD stage 3–4 (CKD I) and CKD stage 5 (CKD II). 30 age-matched subjects with primary nocturnal enuresis and normal kidney function served as controls. The serum concentrations of Hsp90 α , sE-selectin, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 were assessed by ELISA.

Results. The median values of Hsp90 α , sE-selectin, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 were significantly elevated in CKD patients vs. controls. The concentrations kept growing together with the progressing renal failure in the case of sE-selectin and MMP-2, remained unchanged in the case of TIMP-1 and TIMP-2, whereas diminished in the case of Hsp90 α . Several correlations between examined parameters were noticed.

Conclusions. The increased concentrations of Hsp90 α , sE-selectin, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 indicate the enhanced cell damage, aggravation of inflammatory and proteolytic processes, responsible for progression of interstitial renal fibrosis in CKD children. Differences in behaviour of selected parameters in the course of renal failure progression suggest the diversity of their engagement in various stages of CKD.

Key words

Hsp90 α , sE-selectin, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2