

На правах рукописи

**ЧЕБОТАРЕВА**

**Наталья Викторовна**

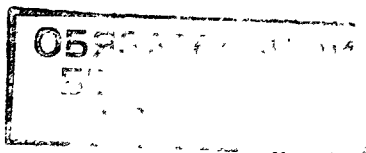
**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ПРОФИБРОГЕННЫХ МЕДИАТОРОВ В МОЧЕ И ТКАНИ  
ПОЧКИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ  
ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ**

14.00.48 - нефрология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук



Москва – 2005

**Работа выполнена в ГОУ ВПО Московской медицинской академии  
им. И.М.Сеченова Росздрава**

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук, профессор      Козловская Лидия Владимировна

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор      Ермоленко Валентин Михайлович

Доктор медицинских наук, профессор      Пилов Евгений Михайлович

**Ведущее учреждение:**

Федеральное государственное учреждение Учебно-научный центр  
Медицинского Центра Управления Делами Президента РФ

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2005г. на заседании  
Диссертационного совета Д.208.040.05 при ГОУ ВПО Московской  
медицинской академии им. И.М.Сеченова Росздрава по адресу: 119992, Москва,  
ул. Трубецкая, д.8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке  
ГОУ ВПО ММА им. И.М.Сеченова Росздрава (117998, Москва, Нахимовский  
проспект, д. 49).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2005г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
Доктор медицинских наук, профессор

Волчкова Елена Васильевна

2006-4  
18069

2190715  
1

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

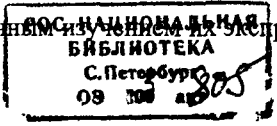
### Актуальность темы.

В настоящее время благодаря многочисленным исследованиям, главным образом в эксперименте, подтверждено первостепенное значение тубуло-интерстициального фиброза (ТИФ) как патоморфологической основы почечной недостаточности, и установлена важная роль протеинурии в его развитии (Bohle A. et al. 1996, Risdon R.A. et al. 1968, Marcussen N. 1990, 2000, Okon K. 2003). Показано, что нефротоксический эффект протеинурии реализуется через интерстициальное воспаление, заканчивающееся развитием ТИФ (Remuzzi G. et al. 1996, Becker G.J. 2000). В основе ТИФ лежат процессы накопления компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) (фибронектина, коллагена I, III, IV типов, ламинина и гепарансульфат-протеогликанов) и апоптоз тубулярных клеток, ведущие к атрофии канальцев, расширению интерстициального объема и потере перитубулярных капилляров (Bottinger et al. 1986, Bohle et al. 1996).

Центральным звеном в этих механизмах является активация тубулярных эпителиальных клеток (Abbate M. et al. 1998) под действием повреждающих компонентов протеинурии с продукцией ими молекулярных медиаторов воспаления и фиброза - моноцитарного хемотаксического протеина -1 (MCP-1) (Wada T. et al., 1996 – 2000) и трансформирующего фактора роста -  $\beta 1$  (ТФР- $\beta 1$ ) (Sneider A at al., 1996), осуществляющих паракринно-аутокринную регуляцию процессов формирования и прогрессирования ТИФ (Yamamoto T. et al. 1994).

В последние годы появилась возможность определения отдельных молекулярных медиаторов воспаления в моче больных хроническим гломерулонефритом (ХГН), однако имеются лишь единичные клинические работы, демонстрирующие взаимосвязь уровня экскреции MCP-1 и TGF- $\beta 1$  со степенью выраженности тубуло-интерстициального повреждения и фиброза (Honkanen E. et al. 1997, Senatorski G. et al., 1998, Wada T. et al., 2000).

Вместе с тем оценка профиброгенных цитокинов в моче больных различными формами ХГН с одновременным изучением их экспрессии в ткани



почки, с одной стороны, способствует расширению представлений о закономерностях формирования ТИФ, с другой стороны, позволяет мониторировать течение ХГН и оценивать прогноз заболевания в целом.

**Цель исследования:**

Определить содержание в моче и почечной ткани больших ХГН профиброгенных медиаторов и уточнить их значение для оценки процессов воспаления и фиброза в почке и как критериев прогноза.

**Задачи исследования:**

1. У больных клинически активными протеинурическими формами ХГН исследовать экскрецию с мочой основных профиброгенных медиаторов – моноцитарного хемотаксического протеина -1 (MCP-1) и трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1);

2. Изучить в различных структурах ткани почки локализацию и степень экспрессии TGF- $\beta$ 1, гладкомышечного  $\alpha$ -актина ( $\alpha$ -ГМА) (маркера миофибробластов) и фибронектина (компонента ЭЦМ).

3. Оценить с помощью морфометрии выраженность воспалительной клеточной инфильтрации и площадь интерстиция в сопоставлении с уровнем экскреции с мочой MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 и экспрессии TGF- $\beta$ 1 и  $\alpha$ -ГМА в ткани почки.

4. На основании сравнения уровня профиброгенных медиаторов в моче и ткани почек больных ХГН определить их значение как показателей интерстициального фиброза и критериев активности заболевания и прогноза.

**Научная новизна исследования.**

Впервые в России в клинических условиях у больных с активными протеинурическими формами ХГН изучены механизмы протеинурического ремоделирования тубуло-интерстиция почки. Впервые в моче больных ХГН разной степени тяжести (без- и с наличием почечной недостаточности) проведена оценка основных профиброгенных медиаторов – MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 в сопоставлении с выраженностью тканевых реакций тубуло-интерстициального воспаления и фиброза: клеточной воспалительной инфильтрации в

интерстиции, количеством интерстициальных миофибробластов, экспрессирующих  $\alpha$ -ГМА, площадью интерстициального фиброза, тканевой экспрессией TGF- $\beta$ 1 и фибронектина. Подтверждена важная роль в прогрессировании ХГН патогенетической цепи: «протеинурия - тубуло-интерстициальная секреция профиброгенных медиаторов – интерстициальное воспаление - фиброз». Впервые показана высокая информативность (чувствительность и специфичность) мочевых показателей MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 как маркеров степени интерстициального фиброза и их значение в определении прогноза ХГН.

#### **Практическая значимость.**

На основании полученных результатов установлено, что повышение экскреции с мочой MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 является информативным неинвазивным методом оценки степени интерстициального воспаления и фиброза в почке при ХГН. Изучение этих медиаторов позволяет выделять среди больных ХГН группу высокого риска формирования почечной недостаточности и в зависимости от предполагаемой степени фиброза определять тактику лечения.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. У больных активными протеинурическими формами ХГН отмечается повышенная экскреция с мочой профиброгенных молекулярных медиаторов - MCP-1 и TGF- $\beta$ 1. Экскреция MCP-1 с мочой коррелирует с величиной протеинурии, у больных с высокой протеинурией этот показатель выше при наличии почечной недостаточности. Экскреция TGF- $\beta$ 1 с мочой повышена, главным образом, у больных со стойкой почечной недостаточностью.

2. Отмечается прямая корреляция между уровнем экскреции MCP-1 с мочой больных ХГН и выраженностью воспалительной клеточной инфильтрации в интерстициальной ткани почек, и между уровнем экскреции MCP-1 и TGF- $\beta$  и величиной тубуло-интерстициального фиброза (ТИФ), что

подтверждает значение этих профиброгенных цитокинов в механизмах формирования ТИФ.

3. У больных с выраженным тубуло-интерстициальным фиброзом и почечной недостаточностью показатели экскреции MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 с мочой тесно коррелируют между собой и количеством интерстициальных миофибробластов, а также с величиной экспрессии в структурах почки фибронектина – основного компонента ЭЦМ, что свидетельствует о значении мочевых показателей MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 в оценке процессов фиброгенеза в тубуло-интерстиции почки.

4. Показатели экскреции MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 обладают высокой чувствительностью и специфичностью в определении прогноза ХГН, при этом повышение экскреции MCP-1 с мочой свидетельствует о выраженности клеточной воспалительной инфильтрации в интерстициальной ткани почки и является ранним маркером усиления процесса ТИФ, а высокий уровень экскреции MCP-1 в моче, особенно в сочетании с повышенной экскрецией TGF- $\beta$ 1 – маркером уже сформированного фиброза.

#### **Внедрение результатов исследования в клиническую практику.**

Результаты настоящего исследования используются при курации больных ХГН в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М.Тареева ММА им. И.М.Сеченова. Полученные практические и теоретические выводы применяются в учебном процессе кафедры терапии и профзаболеваний медико-профилактического факультета ММА им.И.М.Сеченова, кафедры нефрологии ФГПО, отдела нефрологии НИЦ ММА им.И.М.Сеченова, кафедры фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова.

### **Апробация работы.**

Апробация работы проведена 12 мая 2005года на совместном заседании кафедры терапии и профболезней медико-профилактического факультета, кафедры нефрологии и гемодиализа ФГПО, отдела нефрологии НИЦ ГОУ ВПО ММА им. И.М.Сеченова. Материалы работы доложены и обсуждены на заседаниях 6-й и 7-й Российско-французской школы-семинара (Липки 2003г-2005г.), на конгрессе «Нефрология и диализ сегодня» (г. Новосибирск, март 2004г.), школе-семинаре «Актуальные проблемы хронической почечной патологии», (г. Великий Новгород, сентябрь 2003г.), на международной научно-практической конференции «Неделя нефрологии в Москве» (июнь 2004г.), XI Всероссийском Национальном Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, апрель 2004г.), на нефрологической конференции, посвященной юбилею Московского Нефрологического Центра (Москва, март 2004г.), на международном конгрессе ERA-EDTA (Стамбул, июнь 2005г.), научно-практической конференции «Нефрология и диализ в Сибири» (Иркутск, август 2005г.)

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, содержащих основной материал диссертации.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 117 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав «материалы и методы исследования», «результаты собственного исследования и их обсуждение», заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы содержит 171 источник, из которых отечественных – 13 и зарубежных - 158. Диссертация иллюстрирована 36 рисунками, 15 таблицами, 3 клиническими наблюдениями.

### База проведения исследования

Основной базой проведения исследования были кафедра терапии и профессиональных болезней медико-профилактического факультета (зав. кафедрой – академик РАМН, профессор Мухин Н.А.), нефрологическое отделение клиники нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова (зав. нефрологическим отделением – Мирошниченко Н.Г.). Изучение биопсийного материала проведено профессором В.А.Варшавским на кафедре патологической анатомии (зав. – академик РАН и РАМН проф. Пальцев М.А.).

Глубокую благодарность автор выражает своему научному руководителю – профессору Л.В. Козловской за повседневную помощь в работе над диссертацией. Автор признателен академику РАМН профессору Мухину Н.А. за предоставленную возможность выполнения работы в клинике нефрологии, терапии и профессиональных болезней ММА им. И.М. Сеченова.

Автор выражает особую благодарность профессору кафедры патологической анатомии ММА им. И.М. Сеченова д.м.н. В.А.Варшавскому и к.б.н. Е.П.Голицыной за ценную консультативную помощь и возможность проведения морфологической части работы на кафедре патологической анатомии ММА им. И.М. Сеченова. Автор приносит глубокую благодарность к.м.н., в.н.с. Бобковой И.Н. за непосредственное участие в проведении исследований, а также сотрудникам иммунологической лаборатории (зав. лабораторией иммунологии - Серова А.Г.) за помощь в проведении иммунологических исследований, межклинической биохимической лаборатории (зав. лабораторией - Александровская Т.Н.) и всем сотрудникам клиники им. Е.М. Тареева за содействие в работе.



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

### 1. Общая характеристика обследованных больных.

Обследовано 83 больных активными формами хронического гломерулонефрита (ХГН): 49 (59%) женщин и 34 (41%) мужчин в возрасте от 15 до 69 лет (средний возраст  $33 \pm 13,8$  лет), наблюдавшихся в клинике нефрологии, внутренних и профболезней им. Е.М.Тареева Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова с 1996г. по 2004 год. Контрольную группу составили 12 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными ХГН, 6 мужчин и 6 женщин от 21 до 37 лет (средний возраст  $29 \pm 5$  лет). Среди 83 обследованных больных ХГН диагноз был подтвержден морфологически у 45; у 15 выявлен мезангиопролиферативный нефрит, у 10 - мезангиокапиллярный нефрит, у 6 - мембранозный нефрит, у 4 - фокально-сегментарный гломерулосклероз, у 3 - нефрит с минимальными изменениями, у 7 - фибропластический гломерулонефрит (по классификации Серова В.В. 1980г.).

Результаты исследования молекулярных медиаторов сравнивали в 3-х группах больных, различающихся по степени активности ХГН и выраженности почечной недостаточности.

I группу составили 26 больных с умеренным мочевым синдромом, у которых наблюдалось обострение заболевания (нарастание протеинурии, усиление гематурии). Протеинурия в этой группе составила в среднем  $1,3 \pm 0,2$  г/сут.; у 7 отмечалась изолированная протеинурия субнефротического уровня, у 9 - протеинурия сочеталась с умеренной эритроцитурией (до 30-40 в п/зр.) и у 10 - с выраженной эритроцитурией (сплошь все п/зр.). Функция почек у всех больных I группы была в пределах нормы (креатинин сыворотки крови  $1,06 \pm 0,04$  мг/дл), артериальная гипертензия (максимально до 170/100 мм рт. ст.) наблюдалась у 3 больных. Длительность нефрита в I группе составила от 1,5 мес. до 20 лет (в среднем  $6,6 \pm 1,2$  лет).

Во II группу включены 38 пациентов с НС, признаки которого были отчетливо выражены: отеки различной степени и локализации, протеинурия,

достигавшая в отдельных случаях 12-13,5 г/сут (в среднем  $5,5 \pm 0,6$  г/сут.), гипоальбуминемия ( $2,5 \pm 0,11$  г/дл). У 19 больных наряду с массивной протеинурией выявлено преходящее нарушение функции почек (креатинин от 1,6 мг/дл до 2,8 мг/дл, в среднем  $1,9 \pm 0,07$  мг/дл) как показатель высокой активности нефрита, среди них у 12 - также гематурия, артериальная гипертония (остронефритический синдром). Длительность нефрита во II группе составила в среднем  $2,7 \pm 0,7$  лет, длительность НС к моменту обследования -  $6,6 \pm 0,86$  мес.

В III группу вошли 19 пациентов с выраженной протеинурией (у 13 - нефротического уровня, в среднем  $4,6 \pm 0,8$  г/сут), гематурией (от 10-15 в п/зр. до сплошь в п/зр.), и в отличие от предыдущей группы - стойким нарушением функции почек (креатинин сыворотки крови в среднем  $3,6 \pm 0,8$  мг/дл) и тяжелой артериальной гипертонией (АД систолическое 160 - 220 мм рт.ст., АД диастолическое 100 - 130 мм рт. ст.). При морфологическом исследовании ткани почки у больных этой группы выявлен значительный фиброз. Длительность нефрита в III группе составила в среднем  $4,5 \pm 1,0$  лет.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных ХГН ( $M \pm m$ )

Показатели	I группа (с мочевым синдромом) n=26	II группа (с НС) n=38	III группа (со стойкой почечной недостаточностью) n=19
Суточная протеинурия г/сут	$1,3 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,8$
Альбумин сыворотки г/дл	$4,1 \pm 0,08$	$2,6 \pm 0,11$	$3,1 \pm 0,2$
Общ. белок сыворотки г/дл	$6,9 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$
Креатинин сыворотки крови мг/дл	$1,06 \pm 0,04$	$1,4 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,8$
Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по Кокрофту мл/мин	$101 \pm 6,7$	$81 \pm 5,8$	$33 \pm 3,7$
АД сист. мм рт. ст.	$125 \pm 3,6$ (90-170)	$142 \pm 4,1$ (100-210)	$166 \pm 6,9$ (140-220)
АД диаст. мм рт. ст.	$79 \pm 2,4$ (90-110)	$90 \pm 2,4$ (70-150)	$100 \pm 3,9$ (80-130)

У большинства (51) больных исследования молекулярных медиаторов проводили до начала иммуносупрессивной терапии. У остальных (32) больных - на фоне продолжения начатой ранее стандартной иммуносупрессивной терапии преднизолоном (ПЗ) per os, у части - в сочетании с «пульсами» ПЗ внутривенно и «пульсами» циклофосфана (у этих больных забор крови и мочи для исследования проводили в интервалах между «пульсами»).

## 2 Специальные методы обследования.

Уровень экскреции с мочой MCP-1 и TGF- $\beta$  исследовали у 63 больных методом непрямого иммуноферментного анализа (ELISA). Для определения уровня MCP-1 в моче больных ХГН использовали систему BioSource International, Immunoassay Kit, США, Бельгия. Для определения TGF- $\beta$ 1 в моче - систему анти-TGF- $\beta$ 1 DRG MTPL EIA-1864, ФРГ. Мочевые показатели MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 были стандартизованы по величине креатинина в утренней моче.

В ткани почек 45 больных ХГН определяли экспрессию гладкомышечного  $\alpha$ -актина ( $\alpha$ -ГМА) - маркера миофибробластов, а также фибронектина - основного компонента ЭЦМ. У 16 больных параллельно исследованию TGF- $\beta$ 1 в моче провели изучение этого цитокина в ткани почки. Эти три показателя изучили иммуногистохимическим пероксидазным методом с использованием моноклональных антител мыши к  $\alpha$ -ГМА (клон 1A4, DAKO, Дания) и TGF- $\beta$ 1 (клон TB21, BioSource International, USA, Belgium), а также антисыворотки кролика к фибронектину (DAKO, Дания). Результат реакции оценивали морфометрически по интенсивности коричневой окраски (модифицированный принцип Weibel). Для контроля указанные показатели также были оценены в 7 образцах ткани здоровой почки, полученной в ходе различных оперативных вмешательств (без признаков опухоли или сосудистой патологии).

Среди 45 больных ХГН, которым была проведена биопсия почки, у 25 измеряли площадь (относительный объем) интерстиция коркового слоя почки (в 10-12 полях зрения при увеличении  $\times 400$ ) и степень клеточной воспалительной лейкоцитарной инфильтрации по количеству ядер в корковом

слое почек на участке в  $1,5\text{мм}^2$  с использованием программ для морфометрии (ДиаМОРФ, ADOBE PHOTOSHOP CS).

### **3. Методы статистической обработки**

Статистический анализ результатов проводили с применением стандартных статистических методик (программа STATISTICA 6,0). Мочевые показатели МСР-1 и TGF- $\beta$ 1, показатели интерстициальной экспрессии  $\alpha$ -ГМА были распределены ненормально, в связи с чем эти показатели описывали с помощью медианы. Разброс величин по отношению к медиане характеризовали показателем интерквартильного размаха (25%, 75% процентиля), куда входят 50% всех полученных показателей. Для сравнения двух групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, для непараметрического множественного сравнения выборок разного объема – критерий Дана. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.**

### **1. Уровень МСР-1 в моче больных ХГН**

У всех больных ХГН уровень экскреции МСР-1 с мочой был выше, чем у здоровых лиц, и зависел от степени активности нефрита. Так, у больных с нефротическим синдромом (НС) он был достоверно выше, чем у пациентов с умеренным мочевым синдромом, а наиболее высокая мочевая экскреция МСР-1 отмечена у больных III группы с выраженными протеинурией и стойкой почечной недостаточностью (таблица 2).

Таблица 2.

## Экскреция МСР-1 с мочой больных ХГН

Группы больных	n=63	МСР-1
		пг/мл/ креатинин мочи
I группа <i>с мочевым синдромом</i>	23	4,08* (1,7-7,6)
II группа <i>с НС</i>	29	7,85** (4,6-16)
III группа <i>со стойкой почечной недостаточностью</i>	11	29,0*° (19-57)
контрольная группа	12	0,34 (0,21-0,86)

\*  $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой, \*\* $p < 0,01$  по сравнению с I группой,

° $p < 0,05$  по сравнению с I и II группами

Связь уровня МСР-1 в моче с высокой активностью нефрита была особенно очевидной при рассмотрении этого показателя отдельно в группе больных с НС. У пациентов с НС и преходящей почечной недостаточностью, то есть у больных с наибольшей клинической активностью нефрита, он был достоверно выше, чем у больных с сохранной функцией почек ( $p < 0,05$ ) (рисунок 1).

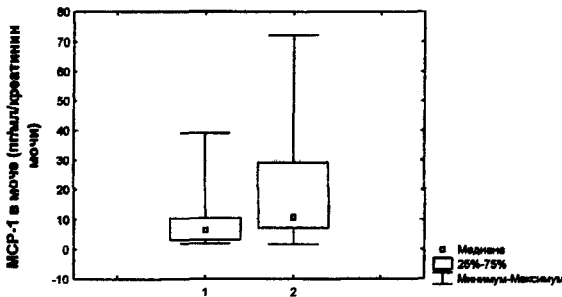


Рисунок 1. Уровень экскреции МСР-1 в моче больных ХГН без (1) и с преходящим нарушением функции почек (2).

Величина экскреции МСР-1 с мочой при всех морфологических типах ХГН прямо коррелировала с выраженностью клеточной воспалительной инфильтрации в интерстиции почек, что подтверждает ведущую роль МСР-1 в формировании интерстициального воспаления с исходом в фиброз (рисунок 2).

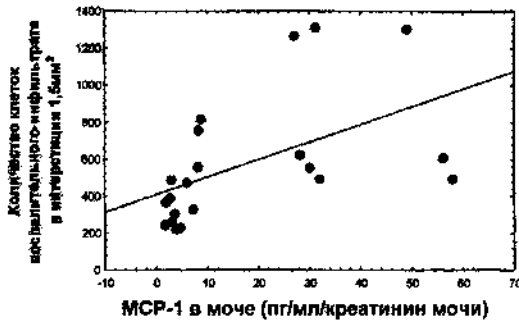
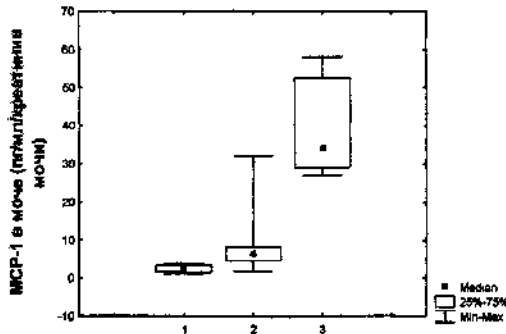


Рисунок 2. Уровень экскреции MCP-1 с мочой больных ХГН в зависимости от выраженности клеточной воспалительной инфильтрации в интерстиции почек ( $r_s=0,71$ ,  $p<0,001$ )

О значении данного механизма в формировании интерстициального фиброза свидетельствуют и результаты проведенного нами морфометрического анализа. У больных с площадью интерстиция более 20% экскреция с мочой MCP-1 была достоверно выше, чем у больных с меньшей площадью интерстиция (фиброза) (рисунок 3). Между этими показателями выявлена сильная прямая корреляция ( $r=0,8$ ,  $p<0,001$ ).



- 1 – площадь интерстиция < 10%,  
 2 – площадь интерстиция 10-20%,  
 3 – площадь интерстиция > 20%,  $p<0,001$

Рисунок 3. Уровень экскреции MCP-1 с мочой больных ХГН в зависимости от площади интерстиция

Нами проведен анализ показателей экскреции MCP-1 в зависимости от локализации фиброзных изменений в клубочках и интерстиции почек: экскреция MCP-1 с мочой была значительно выше при наличии тубуло-

интерстициального фиброза (таблица 3). Эти данные подтверждают признаваемую в настоящее время роль MCP-1 как основного хемокина, действующего преимущественно на территории интерстиция.

Таблица 3

Уровень экскреции MCP-1 с мочой больных ХГН в зависимости от локализации фиброза в клубочках и интерстиции

Локализация фиброзных изменений в ткани почки	N	MCP-1 пг/мл·креатинин мочи
1. Гломерулосклероз (-) ТИФ (-)	12	4,6 (1,9-8,0)
2. Гломерулосклероз (+) ТИФ (-)	5	2,9 (2,1-2,9)
3. Гломерулосклероз (+) ТИФ (+)	8	30,5** (18,3-52,5)

\* $p < 0,01$  по сравнению с 1, \*\* $p < 0,05$  по сравнению со 2, N – число обследованных больных в каждой группе. В таблицах представлены показатели медианы и интерквартильного размаха

## 2. Уровень TGF- $\beta$ 1 в моче больных ХГН

Уровень экскреции с мочой TGF- $\beta$ 1 у больных ХГН был достоверно выше, чем у здоровых лиц. Этот показатель не зависел от величины протеинурии: у больных с умеренным мочевым и нефротическим синдромами (I и II групп) он практически не отличался, но был значимо выше у больных III группы с НС и стойкой почечной недостаточностью (таблица 4).

Таблица 4

### Экскреция TGF- $\beta$ 1 с мочой больных ХГН

Группы больных	n=63	TGF- $\beta$ 1 пг/мл/креатинин мочи
I группа с мочевым синдромом	23	1,65* (0,7-2,2)
II группа с НС	29	1,1* (0,4-2,4)
III группа со стойкой почечной недостаточностью	11	3,0* <sup>o</sup> (2,2-4,6)
контрольная группа	12	0,2 (0-0,4)

\*  $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой, <sup>o</sup> $p < 0,05$  по сравнению с I и II группами

Выявлена прямая корреляция между показателем экскреции TGF- $\beta$ 1 и уровнем сывороточного креатинина ( $r_s=0,5$ ,  $p<0,05$ ) и обратная корреляция между ним и скоростью клубочковой фильтрации, рассчитанной по Кокрофту ( $r_s=-0,6$ ,  $p<0,01$ ).

При морфометрическом исследовании показано, что экскреция TGF- $\beta$ 1 была значительно выше у больных с площадью интерстиция более 20%, то есть при выраженном интерстициальном фиброзе (таблица 5). Таким образом, экскреция с мочой этого профиброгенного фактора роста зависела главным образом от степени почечной недостаточности и выраженности фиброза в интерстиция почки.

Таблица 5

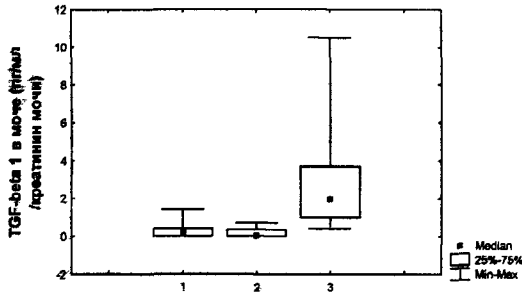
Уровень экскреции TGF- $\beta$ 1 с мочой в зависимости от площади интерстиция

Площадь интерстиция, %	N	TGF- $\beta$ 1 пг/мл/креатинин мочи
<10 %	4	0,5 (0,15-0,8)
10-20%	13	0,7 (0,14-1,7)
>20%	8	2,5* (2,2-4,6)

\* $p<0,05$

Высокий уровень TGF- $\beta$ 1 в моче обнаруживался у тех больных ХГН, у которых выявлялась его экспрессия в интерстиции почки (рисунок 4), что подтверждает, с одной стороны, локально-почечное происхождение этого цитокина в моче, с другой стороны, его участие в формировании интерстициального фиброза.





- 1 – здоровые, экспрессия TGF-β1 в интерстиции (-),  
 2 – больные ХГН, экспрессия TGF-β1 в интерстиции (-),  
 3 – больные ХГН, экспрессия TGF-β1 в интерстиции (+),  $p < 0,05$

**Рисунок 4. Уровень экскреции TGF-β1 с мочой в зависимости от его локализации в ткани почки**

О содружественном участии MCP-1 и TGF-β1 в ремоделировании тубуло-интерстиция свидетельствует выявленная нами прямая корреляция между показателями экскреции с мочой этих цитокинов у больных с почечной недостаточностью ( $r_s=0,6, p<0,01$ ).

### **3. Иммуногистохимическое исследование гладкомышечного α-актина (α-ГМА) и фибронектина в биоптатах почек больных ХГН**

В интерстиции почек больных ХГН изучили содержание основных продуцентов экстрацеллюлярного матрикса - миофибробластов, экспрессирующих α-ГМА. Наиболее высокой экспрессия α-ГМА в интерстиции была у больных II группы с НС и проходящей почечной недостаточностью (ПН) и у больных III группы со стойкой почечной недостаточностью, то есть высокоактивными прогрессирующими формами ХГН (таблица 6).

**Таблица 6**

**Экспрессия  $\alpha$ -ГМА миофибробластами в интерстиции почек больных ХГН**

Группы больных ХГН		n=45	Экспрессия $\alpha$ -ГМА в интерстиции, %
<i>I с мочевым синдромом</i>		11	9,0 (6,6-10,0)
<i>II. – с НС</i>	<i>1. с НС без ПН</i>	15	9,5 (7,1-11,9)
	<i>2. с НС и преходящей ПН</i>	6	21,6* (21,4-24,2)
<i>III. с НС и стойкой ПН</i>		13	25,3* (18,6-31,7)

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  по сравнению с I и II.1.

Именно у больных с почечной недостаточностью отмечена прямая корреляция между количеством миофибробластов в интерстиции и уровнем креатинина сыворотки крови ( $r_s = 0,7$ ,  $p < 0,001$ ).

При морфометрическом исследовании отмечена зависимость экспрессии  $\alpha$ -ГМА в интерстиции от площади фиброза. У пациентов с площадью тубулоинтерстициального фиброза (ТИФ) более 20% экспрессия  $\alpha$ -ГМА была достоверно выше, чем у больных с меньшей площадью ТИФ (таблица 7).

**Таблица 7**

**Уровень экспрессии  $\alpha$ -ГМА миофибробластами в зависимости от наличия ТИФ**

	n	Экспрессия $\alpha$ -ГМА в интерстиции, %
ТИФ (-)	25	8,8 (6,6-11,0)
ТИФ (+)	20	*22,2 (19,5-24,7)

\* $p < 0,0001$

Обнаружена экспрессия  $\alpha$ -ГМА клетками канальцев почек, причем именно у больных с высоким содержанием TGF- $\beta$ 1 в моче (рисунок 5). Это подтверждает установленный преимущественно в эксперименте факт трансформации под влиянием TGF- $\beta$ 1 клеток тубулярного эпителия в миофибробласты, которые пополняют пул интерстициальных миофибробластов, продуцирующих экстрацеллюлярный матрикс (фиброз).

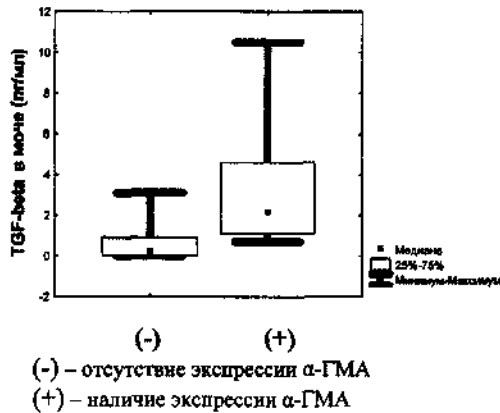


Рисунок 5. Уровень экскреции TGF-β1 с мочой больных ХГН в зависимости от экспрессии α-ГМА клетками канальцев почек,  $p < 0,05$

Нами выявлена сильная прямая корреляция между площадью интерстиция (фиброза), инфильтрацией тубулоинтерстиция миофибробластами и уровнем мочевого экскреции MCP-1 и TGF-β1 (таблица 8).

Таблица 8

Корреляция между уровнем экспрессии α-ГМА миофибробластами в интерстиции, его площадью, уровнем экскреции MCP-1 и TGF-β1 с мочой

Показатели	Уровень экспрессии α-ГМА в интерстиции
Площадь интерстиция	$R_s=0,8, p<0,001$
TGF-β1 пг/мл/ креатиния мочи	$R_s=0,6, p<0,05$
MCP-1 пг/мл/ креатиния мочи	$R_s=0,7, p<0,05$

Нами отмечена также связь между повышенной экспрессией основного компонента экстрацеллюлярного матрикса - фибронектина и нарастанием тубуло-интерстициального фиброза. Наиболее выраженные отложения фибронектина были выявлены у больных с диффузным интерстициальным фиброзом (рисунок 6).

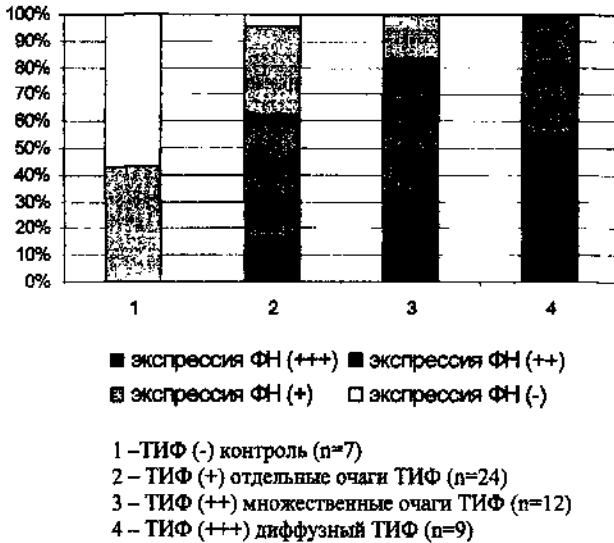


Рисунок 6. Уровень экспрессии фибронектина в биоптатах почки больных ХГН в зависимости от выраженности тубуло-интерстициального фиброза (ТИФ)

#### 4. Определение чувствительности и специфичности «мочевых» тестов - MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 для оценки степени интерстициального фиброза

С целью определения информативности изученных нами мочевых тестов для оценки тубуло-интерстициального фиброза в почке при ХГН мы рассчитали специфичность и чувствительность каждого из них и определили те концентрации MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 в моче, которые с высокой точностью отражают накопление ТИФ (площадь интерстиция более 20% коркового слоя). Эти концентрации соответствовали дискриминационным точкам пересечения кривых чувствительности и специфичности: концентрация в моче MCP-1 - выше 20 пг/мл (чувствительность - 100% , специфичность - 89%), концентрация в моче TGF- $\beta$ 1 - выше 2,0пг/мл (чувствительность ~ 83%, специфичность 78% (рисунок 7). Далее мы попытались установить минимальные концентрации в моче обоих цитокинов достаточные для того, чтобы судить о ранних фиброзных изменениях в почечном интерстиции. Установлено, что MCP-1 уже с уровня 4,0 пг/мл может отражать увеличение

площади интерстиция (более 10% общей площади коркового слоя). И хотя чувствительность и специфичность (82% и 75% соответственно) этого показателя ниже, чем предыдущего, он может быть использован как маркер ранней фазы формирования фиброза (рисунок 8).

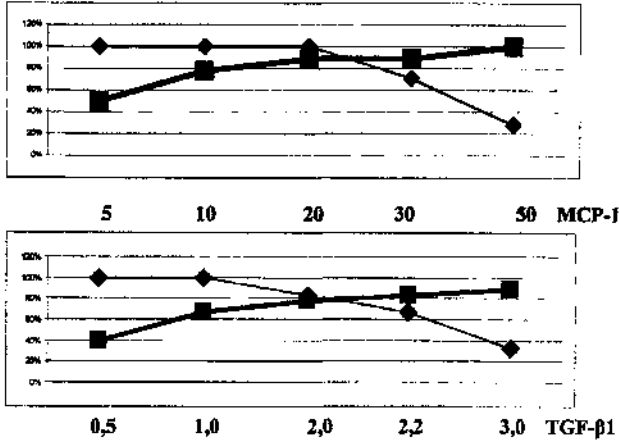


Рисунок 7. Информативность показателей экскреции с мочой MCP-1 и TGF-β1 (пг/мл/креатинин мочи) для оценки выраженного интерстициального фиброза (>20% коркового слоя) почек

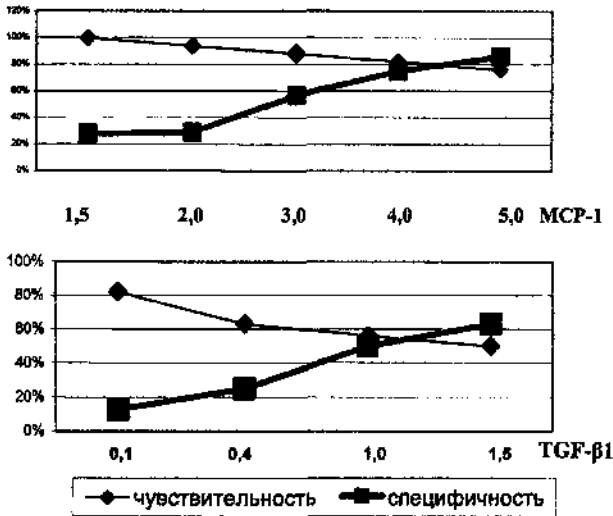


Рисунок 8. Информативность показателей экскреции с мочой MCP-1 и TGF-β1 (пг/мл/креатинин мочи) для оценки начальных изменений в интерстиции (>10% коркового слоя) почек

В то же время более низкие концентрации TGF- $\beta$ 1 в моче оказались недостаточно чувствительными (56%) и специфичными (50%) в оценке начальной стадии ТИФ. По нашему мнению, только уровень TGF- $\beta$ 1 в моче более 2,0 пг/мл информативен как маркер ТИФ, указывая на уже сформированный фиброз.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлены два основных показателя процессов фиброгенеза в почке - уровень экскреции с мочой MCP-1 и TGF- $\beta$ 1. Доступность материала исследования позволяет мониторировать процессы накопления фиброзной ткани в почке и, следовательно, оценивать прогноз ХГН, что важно для определения тактики лечения больных на каждом этапе течения заболевания.

## **ВЫВОДЫ.**

1. У больных активными протеинурическими формами ХГН в отличие от здоровых лиц выявляется повышенная экскреция с мочой профиброгенных молекулярных медиаторов - MCP-1 (основного хемотаксического цитокина, участвующего в тубуло-интерстициальном повреждении) и TGF- $\beta$ 1 (ключевого фактора фиброгенеза в почке), уровень которых зависит от особенностей клинического течения ХГН и выраженности морфологических изменений тубуло-интерстициальной ткани почек.

2. Экскреция MCP-1 с мочой коррелирует со степенью активности нефрита: у больных с нефротическим синдромом (НС) мочевого показатель MCP-1 выше, чем у больных с обострением ХГН без НС, а при наличии НС - выше у больных более тяжелой прогрессирующей формой ХГН с почечной недостаточностью, чем у больных с сохранной функцией почек. Уровень экскреции TGF- $\beta$ 1 с мочой больных с активными формами ХГН зависит от величины креатининемии: статистически значимое повышение экскреции TGF- $\beta$ 1 отмечается главным образом у больных со стойким нарушением функции почек.

3. У больных с разными морфологическими типами ХГН определяется связь между уровнем экскреции MCP-1 с мочой и выраженностью интерстициальной воспалительной клеточной инфильтрации, а также между уровнем экскреции обоих цитокинов – MCP-1 и TGF- $\beta$ , и величиной тубуло-интерстициального фиброза (ТИФ), оцененной по площади интерстиция.

4. У больных ХГН с выраженным фиброзом в интерстиции почек и почечной недостаточностью мочевые показатели MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 тесно коррелируют между собой и количеством основных продуцентов ТИФ - интерстициальных миофибробластов, экспрессирующих  $\alpha$ -ГМА, именно у этих больных в интерстиции выявляются массивные отложения фибронектина.

5. В биоптатах почек больных ХГН тяжелого прогрессирующего течения с почечной недостаточностью  $\alpha$ -ГМА экспрессируется как интерстициальными миофибробластами, так и клетками тубулярного эпителия, указывая на процесс трансдифференциации тубулярных клеток в интерстициальные профиброгенные миофибробласты. Преимущественно в тубуло-интерстиции выявляется и повышенная экспрессия фактора роста для миофибробластов - TGF- $\beta$ , сочетающаяся с высокой экскрецией TGF- $\beta$  с мочой этих больных.

6. Полученные результаты свидетельствуют о значении MCP-1 и TGF- $\beta$ 1, экскретируемых с мочой больных ХГН, как маркеров фиброгенеза в тубуло-интерстиции почки. Оба показателя обладают высокой чувствительностью и специфичностью в определении прогноза ХГН, при этом уровень экскреции MCP-1 может быть использован как ранний маркер усиления процесса ТИФ, а в сочетании с повышенным уровнем экскреции TGF- $\beta$ 1 – для оценки уже сформированного фиброза.

### Практические рекомендации.

1. У больных ХГН исследование экскреции с мочой MCP-1 и TGF- $\beta$ 1 может быть использовано для мониторингирования процесса воспаления и фиброза в почечном интерстиции и, следовательно – для оценки прогноза и определения тактики лечения.

2. Повышение MCP-1 в моче больных ХГН ( $\geq 4,0$  пг/мл  $\leq 20,0$  пг/мл) отражает выраженность клеточной воспалительной реакции в интерстициальной ткани почки с усилением процессов фиброзирования и обосновывает применение активной иммуносупрессивной терапии.

3. Высокий уровень экскреции MCP-1 с мочой (более 20,0 пг/мл) в сочетании с повышенной экскрецией TGF- $\beta$ 1 (более 2,0 пг/мл) указывает на выраженность процессов фиброза в почке и является показанием для нефропротективной стратегии (ингибиторы АПФ, блокаторы АТ рецепторов, статины и др.).



**Список работ, опубликованных по теме диссертации.**

1. Козловская Л.В., Бобкова И.Н., Варшавский В.А., Проскурнева Е.П., Мировишниченко Н.Г., Чеботарева Н.В., Мухин Н.А. Фибронектин мочи как показатель процессов фиброобразования в почке при нефрите// Терапевтический архив. – 1999. – том 71. - N 6. – С. 34-39.
2. Чеботарева Н.В., Проппе Д., Рудольф П., Козловская Л.В. Клиническое значение экспрессии гладкомышечного актина- $\alpha$  и CD34-антигена мезангиальными клетками при гломерулонефрите// Терапевтический архив. – 2002. –том 74. - N6. – С. 27-31.
3. Tchegotareva N., Proppe D., Rudolph P., Koslovskaya L. «Clinical significance of alfa-SMA and CD34 expression in mesangial cell in glomerulonephritis»// EDTA, Abstracts, Vienna, Austria. - June 2001.- P.24-27.
4. Чеботарева Н.В., Плиева О.К. Клиническое значение обнаружения фибронектина в биоптате почки больных гломерулонефритом//Материалы научно-практических конференций, посвященных 55-летию сотрудничества ММА им. И.М. Сеченова и здравоохранения Тульской области, Москва – Тула. – 2002. – С. 329-330.
5. Козловская Л.В., И.Н. Бобкова И.Н., Щербак А.В., Чеботарева Н.В., Плиева О.К., Варшавский В.А., Голицына Е.П. Клиническое значение определения в моче больных гломерулонефритом молекулярных медиаторов воспаления// Нефрология. Санкт-Петербург.- 2003.- том 7.- С. 197-198.
6. Чеботарева Н.В. Клиническое значение экспрессии гладкомышечного  $\alpha$ -актина и CD34-антигена мезангиальными клетками при гломерулонефрите//Материалы клинической конференции молодых ученых факультета послевузовского профессионального образования. Москва. – 2003. - С.351.
7. Козловская Л.В., Бобкова И.Н., Плиева О.К., Чеботарева Н.В., Щербак А.В., Мухин Н.А. Значение исследования в моче молекулярных медиаторов иммунного воспаления и фиброза в почке при хроническом гломерулонефрите// Терапевтический архив.- 2004.- N9. - С. 84-87.

8. Н.А. Мухин, Л.В.Козловская, И.Н. Бобкова, В.В. Рамеев, Н.В. Чеботарева, О.К. Плиева, А.В. Щербак, В.А. Варшавский, Е.П.Голицына. Ключевая роль ремоделирования тубулоинтерстиция в прогрессировании хронических заболеваний почек// Архив патологии. - 2004.- №6.- С. 16 -22.

9. Н.А. Мухин, Л.В. Козловская, И.Н. Бобкова, О.К. Плиева, Н.В. Чеботарева, А.В. Щербак. Индуцируемые протеинурией механизмы ремоделирования тубулоинтерстиция и возможности нефропротекции при гломерулонефрите// Вестник РАМН. - 2005.- N1.- С. 3-8.

10. Tchegotareva N.V., Bobkova I.N., Kozlovskaya L.V., Muchin N.A. Urinary levels of MCP-1 and TGF- $\beta$ 1 in patients with chronic progressive glomerulonephritis// Abstract Book of XIII Congress ERA-EDTA.- June 2005.- Istanbul.- v27.

**Список сокращений**

**$\alpha$ -ГМА** - гладкомышечный  $\alpha$ -актин

**МСР-1** – моноцитарный хемотаксический протеин-1

**НС** – нефротический синдром

**ПЗ** - преднизолон

**ПН** – почечная недостаточность

**ПУ** - протеинурия

**СКФ** – скорость клубочковой фильтрации

**СПУ** – суточная протеинурия

**TGF- $\beta$ 1** – трансформирующий фактор роста – $\beta$ 1

**ТЭК** – тубулярные эпителиальные клетки

**ТИФ** – тубуло-интерстициальный фиброз

**ФН** - фибронектин

**ХГН** – хронический гломерулонефрит

**ЭЦМ** – экстрацеллюлярный матрикс

№ 20 1 0 1

РНБ Русский фонд

2006-4

18069

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 06.10.2005 г.

Формат 60x90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 607.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,  
2-й учебный корпус, 627 к.