На правах рукописи

Цао Вэньцзин

Клиническое значение клеточно-молекулярных маркеров воспаления у больных первичными подоцитопатиями

3.1.32. Нефрология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент **Чеботарёва Наталья Викторовна**

Официальные оппоненты:
Прокопенко Елена Ивановна, доктор медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», факультет усовершенствования врачей, кафедра трансплантологии, нефрологии и искусственных органов, профессор кафедры
Столяревич Екатерина Сергеевна, доктор медицинских наук, федеральное государственного бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра нефрологии, профессор кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «08» ноября 2022 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.21 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: https://www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент **Брагина Анна Евгеньевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Первичные подоцитопатии – ФСГС, болезнь минимальных изменений (БМИ) и мембранозная нефропатия (МН) являются причиной тяжелого нефротического синдрома (НС) у взрослых. В последние годы отмечается неуклонный рост заболеваемости первичными подоцитопатиями, например, частота выявления фокального сегментарного гломерулосклероза (ФСГС) по данным биопсий почек за последние 10 лет увеличилась на 41%, приближаясь к диабетической нефропатии [Sim J.J., 2016, Hommos M.S., 2017]. Растет вклад подоцитопатий в структуру терминальной хронической болезни почек (ХБП) и потребность в заместительной почечной терапии [Kitiyakara C., 2004]. Доля ФСГС составляет от 15 до 35% в структуре морфологически подтвержденных гломерулопатий с протеинурией и НС [Haas M., 1997, Rivera F., 2004], а МН – от 3 до 15% всех морфологических типов хронического гломерулонефрита/гломерулопатий (ХГН) [Тушина А.К., 2021]. Патогенетические механизмы развития МН в настоящее время достаточно хорошо изучены [Ronco P., 2012, Liu W., 2019, Hoxha E., 2022, Бобкова И.Н. 2014, 2020], в то же время факторы, вызывающие повреждение подоцитов при БМИ и ФСГС, точно не установлены. Предполагают, что в патогенезе идиопатических (первичных) форм БМИ/ФСГС важную роль играют циркулирующие «факторы проницаемости» (ЦФП), которые вызывают повреждение подоцита, что является основой протеинурии [Savin V.J., 1996, Gallon L., 2012, Sharma M., 2015]. Под действием циркулирующих факторов происходит повреждение цитоскелета подоцитов и нарушение взаимодействия с гломерулярной базальной мембраной, результатом является массивное отслоение жизнеспособных подоцитов или апоптоз подоцитов – процессов, приводящих к подоцитопении и развитию НС [Hara M. и соавт.2007, Kriz W. и соавт. 1994, 1998; Sato Y. и соавт. 2009]. В качестве наиболее вероятных кандидатов рассматривают цитокины (интерлейкин-17 (ИЛ-17), фактор некроза опухолей (ФНО), интерлейкин-1бета (ИЛ-1β) и др.), клеточные рецепторы и факторы роста - растворимый рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (suPAR), кардиотрофин-подобный белок-1 (CLCF-1), а также специфические антитела - анти-CD40 антитела и антитела к гидролазе убиквитина 1 (анти-UCH-L1 антитела) [Wei C., 2008, Araya C., 2009, Shao X.S., 2009, Shimada M., 2011, Wei C., 2011, Delville M., 2014, Ford M.L., 2014, Savin V.J., 2015, Sharma M., 2015, Jamin A., 2018]. Однако необходима дальнейшая оценка их значения как специфичных факторов повреждения подоцитов, а также возможности их применения в дифференциальной диагностике различных форм подоцитопатий, протекающих с НС.

Следует отметить, что первичные подоцитопатии – ФСГС и БМИ до сих пор остаются заболеваниями с неизвестным патогенезом и характеризуются высокой частотой рецидивирующих форм или форм, резистентных к имммуносупрессивной терапии [Beer A.,2016, Gibson K.L., 2016, Beaudreuil S., 2017]. В связи с этим изучение патогенетических механизмов подоцитопатий является актуальной проблемой нефрологии, а определение факторов, ответственных за развитие или обострение заболевания, имеет важно значение для прогнозирования течения и ответа на терапию.

Степень разработанности темы

Изучение роли подоцитов в механизмах развития протеинурии и прогрессирования хронического гломерулонефрита, особенно подоцитопатий (ФСГС, БМИ и МН), является целью современного научного поиска. Предполагают, что прогрессирующее повреждение подоцитов при первичном ФСГС может быть связано с ЦФП. Эта гипотеза сформулирована еще в 1974г. Shalhoub R.J., который предположил существование циркулирующих лимфокинов, повреждающих гломерулярный барьер, позднее группа Savin V.J. и Sharma M. выделили из сыворотки крови больных с возвратным ФСГС циркулирующий фактор, который до сих пор идентифицировать не удалось [Savin V.J., Sharma M. 1996]. В 2008г. Wei C и соавт., опираясь на экспериментальные данные, изучили suPAR у больных ФСГС и показали, что сывороточная концентрация suPAR при этой форме достоверно выше по сравнению с другими формами нефрита [Wei C., 2008 и 2011]. CLCF-1 был также идентифицирован как потенциальный фактор проницаемости при первичном ФСГС более 7 лет назад [Savin V.J., 2015, Sharma M., 2015]. Но уровень CLCF-1 до сих пор не был изучен в сыворотке крови больных ФСГС и другими подоцитопатиями.

Полагают, что Т-клеточный дисбаланс может являться триггерным механизмом в патогенезе подоцитопатий. Повышение количества Th17 клеток и снижение процентного содержания Т регуляторных клеток в ткани почки и циркулирующей крови было обнаружено у больных БМИ [Wang L., 2013, Boumediene A., 2017]. Кроме того, из плазмы больных с рецидивирующим идиопатическим НС были выделены антитела к гидролазе убиквитина (анти-UCH-L1 антитела) и анти-CD 40 антитела, которые вызывали разрушение актинового цитоскелета подоцитов в культуре, а при введении экспериментальным животным вызывали альбуминурию [Delville M. и соавт. 2014; Jamin A., 2018]. Таким образом, в настоящее время многие исследования направлены на поиск факторов, повреждающих подоцитов, однако эти исследования имеют противоречивые результаты, данные при подоцитопатиях человека ограничены.

Цель исследования: Определение в сыворотке крови, моче и ткани почек больных ХГН молекулярных биомаркеров подоцитарного повреждения и их значения для дифференциальной диагностики первичных подоцитопатий и прогнозирования ответа на терапию.

Задачи исследования

1. Изучить частоту первичных подоцитопатий (БМИ, ФСГС и МН), протекающих с протеинурией и НС, среди больных различными формами гломерулонефрита/гломерулопатий, охарактеризовать особенности клинического течения этих форм на современном этапе,
2. Определить уровень suPAR, CLCF-1, анти-CD40 антител и анти-UCH-L1 антитела в сыворотке крови больных различными формами гломерулопатий и оценить их значение как факторов повреждения подоцитов и развития НС в зависимости от морфологического варианта подоцитопатии,
3. Изученные показатели сопоставить с клинико-лабораторными признаками тяжести НС и почечной дисфункции, выраженностью гломерулосклероза и тубуло-интерстициального фиброза,
4. Изучить количество Т регуляторных (Трег) клеток в ткани почек и уровень ИЛ-17 в моче больных различными морфологическими формами гломерулопатий, сопоставить с показателями клинической активности подоцитопатий,
5. Оценить ответ на проводимую иммуносупрессивную терапию (ИСТ) в зависимости от уровня анти-UCH-L1 и анти-CD40 антител в сыворотке крови больных подоцитопатиями.

Научная новизна

Впервые в клинических условиях у больных с подоцитопатиями (ФСГС, БМИ и МН) проведена комплексная оценка нескольких белков-кандидатов на роль факторов проницаемости, повреждающих подоцит (suPAR, CLCF-1, анти-CD40 антитела и анти-UCH-L1 антитела) в сыворотке крови, ИЛ-17 в моче, а также количества Трег клеток в ткани почки.

Выделены специфические сывороточные маркеры отдельных подоцитопатий. Впервые показано, что наибольшей чувствительностью и специфичностью в диагностике болезни минимальных изменений обладают анти-UCH-L1 антитела, в то время как анти-CD40 антитела оказались повышены как у больных ФСГС, так и БМИ. Кроме того, у больных ФСГС подтверждено достоверное повышение в крови suPAR – фактора, ассоциированного с повреждением области прикрепления подоцита к ГБМ и их отслоением.

У больных ФСГС/БМИ выявлен дисбаланс Т лимфоцитов хелперов с гиперпродукцией интерлейкина-17 и снижением количества Т регуляторных клеток в ткани почки. Определена

возможность использования изученных показателей в сыворотке крови и моче для оценки течения ХГН и прогноза эффективности терапии.

Теоретическая и практическая значимость

На основании полученных результатов определено значение нескольких факторов, а именно suPAR, анти-UCH-L1 антител, анти-CD40 антител, Th17 и Трег клеток в механизмах повреждения подоцитов при первичных подоцитопатиях.

Сформулирована гипотеза о развитии Th клеточного дисбаланса локально в почке с гиперпродукцией ИЛ-17 и подавлением Т регуляторных клеток при подоцитопатиях, а также подтверждено участие В клеток в патогенезе этих заболеваний на основании повышения уровня анти-подоцитарных антител, действие которых направлено на область прикрепления подоцитов к гломерулярной базальной мембране или на цитоскелет подоцитов. Кроме того, определение уровня анти-CD40 антител, анти-UCH-L1 антител и suPAR в сыворотке крови имеет практическое значение для дифференциальной диагностики подоцитопатий - БМИ/ФСГС с мембранозной нефропатией и пролиферативными вариантами гломерулонефрита (IgA нефропатией и мембранопролиферативным гломерулонефритом (МПГН)). Кроме того, определение уровня антител может использоваться в клинической практике для разграничения первичных и вторичных форм ФСГС и прогнозирования ответа на терапию.

Методология и методы исследования

Проведено ретроспективное и проспективное когортное исследование. На первом этапе исследования проводился поиск и анализ данных о факторах повреждения подоцитов у больных подоцитопатиями, выделены наиболее перспективные для последующего изучения. Проведен ретроспективный анализ данных историй болезней с 2007 по 2021г. и среди всех случаев хронического гломерулонефрита определена частота первичных подоцитопатий (ФСГС, БМИ и МН). На втором этапе исследования для подтверждения научной гипотезы о механизмах подоцитарного повреждения были собраны клинико-лабораторные данные обследованных больных, прослежен ответ на лечение, изучены предполагаемые факторы повреждения подоцитов в крови, моче и ткани почки, выполнена статистическая обработка материала.

Основные положения, выносимые на защиту

1. За последние пять лет отмечается увеличение числа больных с первичными подоцитопатиями (ФСГС, БМИ и МН) в 1,4 раза. При ФСГС нарастает количество больных как первичной, так и вторичной формой заболевания. В патогенезе первичных подоцитопатий задействованы механизмы активации Т- и В-клеток, которые приводят к повреждению подоцитов, отслоению клеток от гломерулярной базальной мембраны и развитию НС.

2. У больных первичными подоцитопатиями, особенно при ФСГС и БМИ

установлен дисбаланс Th17 и Трег клеток с повышением уровня ИЛ-17 в моче и снижением количества Трег клеток в ткани почки. Помимо Т-клеточной дисфункции в этой группе больных отмечается повышение продукции В-клетками специфических антител: анти-CD40 и анти-UCH-L1 антител, направленных на отдельные компоненты цитоскелета подоцитов и области их прикрепления к ГБМ. Повышение уровня suPAR в сыворотке крови больных первичным ФСГС также свидетельствует о нарушении адгезии подоцитов к ГБМ.

3. Отмечен достоверно более высокий уровень в сыворотке крови анти-UCH-L1 антител у больных БМИ и анти-CD40 антител - у больных ФСГС и БМИ, чем у больных МН и другими вариантами ХГН. Высокий уровень анти-UCH-L1 антител в сыворотке крови увеличивает вероятность диагностики первичного БМИ, в то время как высокий уровень анти-CD40 антител свидетельствует в пользу стероид-резистентного ФСГС.

4. По уровню анти-UCH-L1 антител и анти-CD40 антител в сыворотке крови можно прогнозировать вероятность достижения ремиссии ФСГС/БМИ при проведении стероидной терапии. У больных со стероид-чувствительным ФСГС/БМИ уровень анти-UCH-L1 антител достоверно выше, а уровень анти-CD40 антител достоверно ниже, чем у больных со стероид-резистентным ФСГС. Эти сывороточные маркеры могут быть использованы для дифференциальной диагностики первичных подоцитопатий и прогнозирования ответа на терапию.

Степень достоверности и апробация результатов

Апробация работы состоялась 21 июня 2022 года на заседании кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии Института клинической медицины им. Н.В.Склифосовского. Материалы диссертации доложены на международном конгрессе «The World Congress of Nephrology 2021», Монреаль, 15-18 апреля 2021г., на международном конгрессе «International Congress on Autoimmunity 2021, Online», Онлайн, 28 мая – 01 июня 2021г., на международной конгрессе «58th ERA-EDTA Congress», Берлин, 05-08 июня 2021г., на международной конференции «The Korean Society of Nephrology», Сеул, 02-05 сентября 2021г., на международной конгрессе «13th International Congress on Autoimmunity», Афины, 10-13 июня 2022г., на XVII Общероссийской научно-практической конференции РДО», совместно с Ассоциацией Нефрологов и «XXI Северо-Западная нефрологическая школа РДО» при поддержке ISN, Санкт-Петербург, 27-28 мая 2022г.

Личный вклад автора

Автор участвовала в разработке идеи, постановке и реализации научных задач (набор пациентов, отбор биологических образцов, формирование базы данных, статистическая обработка и анализ полученных результатов, обсуждение результатов, формулировка выводов и

основных положений, выносимых на защиту). Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты диссертационной работы используются в клинической практике отделений нефрологии УКБ №3 клиники ревматологии, нефрологии и профпатологии им. Е.М. Тареева, основные положения диссертации включены в материалы лекций и практических занятий при изучении дисциплины по выбору Нефрология для студентов ИКМ и Международной школы «Медицины будущего» по направлению подготовки «Нефрология» кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, а также используются в работе нефрологического отделения УКБ №3 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности подготовки 3.1.32. Нефрология (14.01.29 Нефрология). Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 5 и 6 паспорта специальности Нефрология.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 4 - в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, 3 публикации - в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы исследования», «Результаты собственного исследования», «Обсуждение результатов исследования», заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Список литературы содержит 196 источника, из которых 11 отечественных и 185 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 29 рисунками, 27 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

Частоту подоцитопатий в целом и частоту отдельных морфологических вариантов (БМИ, ФСГС, МН) рассчитывали как процент от общего числа гломерулярных заболеваний по результатам биопсий почек, проведенных в Университетской клинической больнице №3 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) с 2007 по 2021 год.

Исследование молекулярных биомаркеров подоцитопатий проведено у 106 больных ХГН/гломерулопатиями: 48 женщин (44,9%) и 58 мужчин (55,1%) в возрасте от 18 до 71 год (медиана 40,3 [25-50] лет), наблюдавшихся в клинике с 2019 по 2021 годы. В контрольную группу вошли 11 здоровых лиц.

При морфологическом исследовании у 35 пациентов был выявлен ФСГС, у 21 - МН, у 15 - БМИ, у 35 - другие морфологические формы: из них у 13 был диагностирован мембранопролиферативный гломерулонефит (МПГН), у 22 - IgA нефропатия.

Первичный и вторичный ФСГС разделяли на основании ведущей клинической и морфологической картины. К первичному ФСГС относили заболевание с острым началом НС без предшествующего почечного анамнеза. К вторичному ФСГС относили заболевание, которое клинически проявлялось протеинурией ненефротического уровня (менее 3-3,5г/сут) при нормальном уровне альбумина сыворотки и выявлении причин для развития вторичной формы ФСГС. Характеристика обследованных больных представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Клинико-лабораторная характеристика обследованных больных ХГН/гломерулопатиями

Параметры	**ФСГС n=35**	**БМИ n=15**	**МН n=21**	**МПГН n=13**	**IgA нефропатия n=22**
Возраст, лет	35 [19-69]	30 [18-59]	46 [26-71]	38 [18-60]	34 [19-67]
Пол, мужчины, n (%)	19 (48,7)	4 (26,7)	17 (81)	7 (63,6)	12 (57,14)
Нефротический синдром, n (%)	33 (84,6)	15 (100)	18 (85,7)	7 (63,6)	8 (38)
Протеинурия, г/сут	3,5 [0,66-15,5]	3,51 [1.8-5,48]	3,6 [1,11-7,9]	3,7 [0,8-8,15]	2,735 [0,1-9]
Альбумин сыворотки, г/л	26,5 [12,9-44,7]	23,7 [20,8-26,9]	29,6 [19,8-36,7]	32,4 [19,6-45,4]	35,7 [20,2-47]
рСКФ, мл/мин/1,73 м^2	62,2 [24-127]	91 [40-140]	78,8 [41-118]	51 [23-101]	54 [14-132,9]
Число больных с рСКФ <60мл/мин, n(%)	18 (46,2)	1 (6,7)	4 (19)	8 (72,7)	12 (57,1)
Артериальная гипертензия, n (%)	26 (66,7)	5 (33,3)	12 (57,14)	10 (90,9)	17 (81)

У 48 больных ХГН забор образцов мочи и крови проводили до начала иммуносупрессивной терапии, у 58 пациентов – на фоне продолжения начатой ранее терапии преднизолоном и/или цитостатиками (циклоспорин А, микофенолата мофетил, ритуксимаб).

У больных ФСГС/БМИ при проведении терапии стероидами оценивали наличие/отсутствие ответа и сроки достижения ремиссии заболевания. ***Полной ремиссией*** считали снижение протеинурии менее 300 мг/сут со стабильной функцией почек; ***частичной ремиссией*** считали снижение протеинурии на 50% или более от исходной с нормализацией белков сыворотки крови – купированием НС при условии улучшения или сохранения стабильной функции почек.

Все больные БМИ (15/15) достигли полной ремиссии НС при лечении высокими дозами стероидов. У 14/29 больных ФСГС отмечался стероид-резистентный НС, 11/29 достигли полной ремиссии; а 6/29 пациентов - неполной ремиссии заболевания.

Определение молекулярных биомаркеров подоцитарной дисфункции в сыворотке крови и моче с помощью иммуноферментного анализа (ИФА)

С помощью специальных методов исследования у больных ХГН были изучены:

Факторы повреждения подоцитов:

Растворимый рецептор активатора плазминогена типа урокиназы (suPAR) – гликозилфосфатидилинозитол- (GPI-) связанный белок клеточной мембраны, экспрессируемый многими типами клеток, например, иммунной системы, эндотелиальными клетками, клетками опухолей, эпителиальными клетками почечных канальцев и подоцитами.

Кардиотрофиноподобный цитокиновый фактор-1 (CLCF-1) – член семейства цитокинов интерлейкина-6, обладающий способностью активировать В-клетки

Антитела к убиквитин-С-концевой гидролазе L1 (анти-UCH-L1 антитела) – к деубиквитинирующему ферменту, который относится к суперсемейству протеаз, контролирующему обмен белков в клетке.

Анти-CD40 антитела – антитела к члену суперсемейства рецепторов ФНО (CD40), фактору, участвующему в процессах иммунитета и воспаления, экспрессируется в подоцитах больных ФСГС,

Интерлейкин-17 (ИЛ-17) – провоспалительный цитокин, секретируемый активированными Th17-лимфоцитами. Уровень ИЛ-17 в моче был скорректирован по креатинину мочи.

В ткани почки с помощью иммуногистохимического окрашивания проводили подсчет Т регуляторных клеток меченых FoxP3 в интерстициальных инфильтратах почки. С помощью

морфометрического подсчета (FoxP3+) ядер было определено число противовоспалительных клеток в интерстициальной ткани почки (в корковом слое площадью 1,5 мм^2).

Спектр изученных мочевых, сывороточных и тканевых показателей и методы их определения представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Методы определения факторов повреждения подоцитов в сыворотке крови, моче и ткани почки больных гломерулопатиями

Изученные показатели	**Метод определения, наборы реактивов для исследования**	**Количество больных**
suPAR (сыворотка)	ИФА (Cloud-Clone Corp., BlueGene, Elabscience Biotechnology, США)	44
CLCF-1 (сыворотка)	ИФА (Cloud-Clone Corp., BlueGene, Elabscience Biotechnology, США)	44
Анти-CD40 антитела (сыворотка)	ИФА (Cloud-Clone Corp., BlueGene, Elabscience Biotechnology, США)	106
Анти-UCH-L1 антитела (сыворотка)	ИФА (Cloud-Clone Corp., BlueGene, Elabscience Biotechnology, США)	106
ИЛ-17 (моча)	eBioscience (Bender MedSystems) Австрия	60
FoxP3 (количество Т рег клеток в воспалительных инфильтратах ткани почки)	поликлональные антитела кролика к FoxP3, SpringBioscience, США	39

Методы статистической обработки

Анализ полученных результатов проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью программных пакетов SPSS 23. Для описания клинико-лабораторных данных рассчитывали медиану и межквартильный размах (IQR), включающий 25-й и 75-й процентили. Применяли непараметрические критерии для попарных и множественных сравнений. При сравнении двух независимых групп использовали U-критерий Манна –Уитни. Для сравнения трех независимых групп и более использовали ранговый анализ вариаций Краскел-Уоллис ANOVA с поправкой Dwass-Steel-Crichlow-Flinger (DSCF) для попарных сравнений. Для выявления и оценки связей между исследуемыми показателями – непараметрический метод ранговой корреляции Спирмена. Для оценки информативности изученных показателей проведен ROC-анализ и рассчитана площадь под кривой (AUC), чувствительность и специфичность. Различия считали достоверными при значении $p<0,05$. Показатели, продемонстрировавшие достоверное значение в диагностике и прогнозировании

ответа при ФСГС/БМИ в монофакторном корреляционном анализе, включали в модель логистической регрессии для проведения многофакторного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структура гломерулопатий по данным нефробиопсий, проведенных в стационаре с 2007 по 2021г.

Частота выявления первичных подоцитопатий (ФСГС, МН и БМИ) среди больных с протеинурией и НС, обследованных в клинике Тареева с 2007 по 2021 год, составила 48,5%: у 10% диагностирован ФСГС, у 16,5% - БМИ, у 22% - МН. Было установлено, что с 2014 г прослеживалась тенденция к уменьшению количества больных с подоцитопатиями до 35%, однако за последние 5 лет (с 2017 по 2021 г) вновь отмечается увеличение числа больных с первичными подоцитарными болезнями до 50% (Рисунок 1).

Рисунок 1 – Структура гломерулопатий по результатам нефробиопсий, проведенных с 2007 по 2021г.

При рассмотрении отдельных морфологических форм установлено, что увеличение числа больных с подоцитопатиями за последние 5 лет происходит за счет большего вклада ФСГС и БМИ, которые составили в целом около 30% биопсий (Рисунок 2).

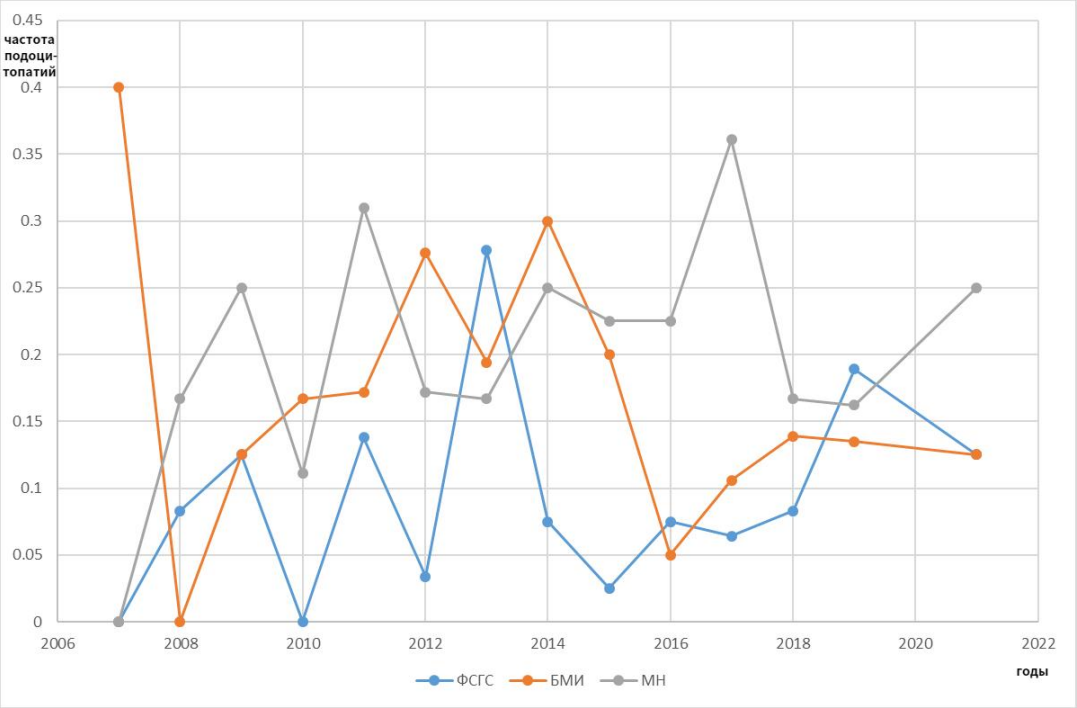


Рисунок 2 – Структура подоцитопатий по результатам нефробиопсий, проведенных с 2007 по 2021гг.

С 2017г. отмечено постепенное увеличение как первичных, так и вторичных форм ФСГС (Рисунок 3).

Рисунок 3 – Количество больных с первичными и вторичными формами ФСГС с 2007 по 2021гг.

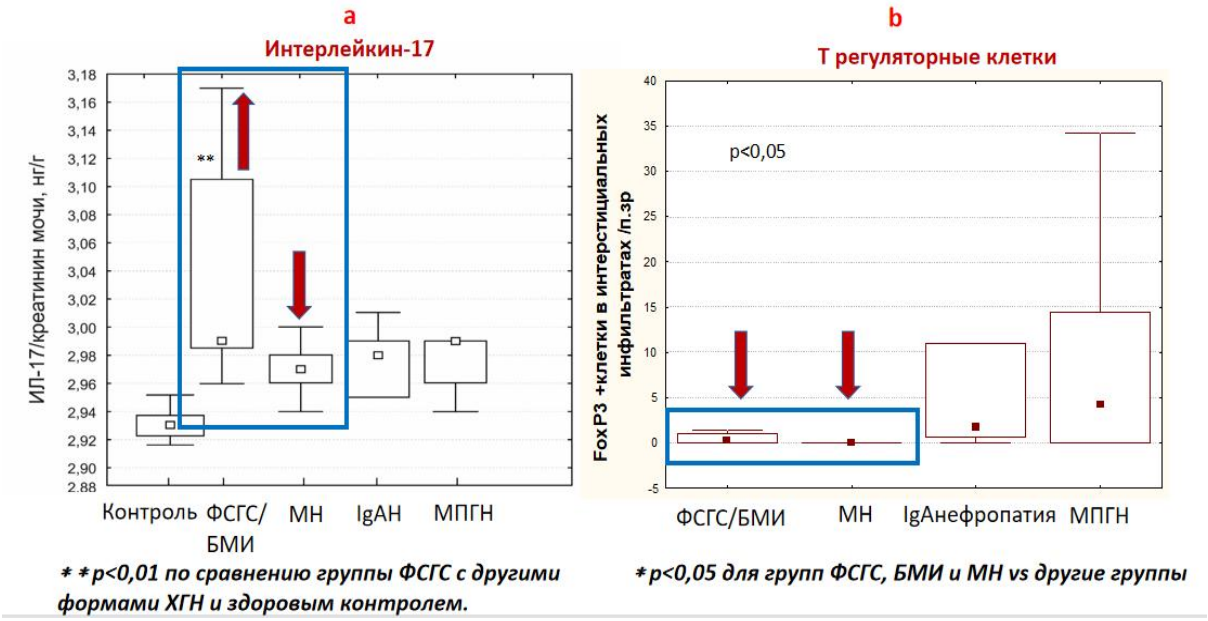
Уровень интерлейкина-17 (ИЛ-17) в моче и количество Трег клеток в ткани почки больных хроническим гломерулонефритом

Опираясь на новые данные о возможном участии ИЛ-17 в апоптозе и отслоении подоцитов от ГБМ, изучен его уровень в моче больных различными формами ХГН. У больных ХГН уровень ИЛ-17 в моче был достоверно выше, чем у здоровых лиц. При рассмотрении

экскреции ИЛ-17 в зависимости от морфологической формы гломерулонефрита оказалось, что уровень ИЛ-17 был достоверно выше в моче больных ФСГС/БМИ, чем при других морфологических формах гломерулопатий, значимых различий по уровню ИЛ-17 в моче в группах больных МН, IgA нефропатией и МПГН выявлено не было (Рисунок 4a).

Не было установлено достоверных корреляций между уровнем ИЛ-17 в моче, показателями протеинурии (Rs=-0,267, p=0,161) и альбумина сыворотки крови (Rs=-0,006, p=0,977). Однако отмечено увеличение экскреции ИЛ-17 с мочой у больных с нарушенной почечной функцией. У больных с рСКФ менее 60 мл/мин/1,73м2 отмечался достоверно более высокий показатель ИЛ-17 в моче 2,99 [2,98; 3,00] нг/г Cr, чем у больных с СКФ более 60 мл/мин/1,73м2 2,97 [2,96; 2,99] нг/г Cr, p <0,05.

Помимо активации Th17 клеток снижение количества Treg клеток в ткани почки было установлено при всех первичных подоцитопатиях (ФСГС, БМИ и МН). Однако наиболее выраженный дисбаланс в системе Th17 и Treg клеток, был отмечен у больных ФСГС и БМИ (Рисунок 4b).



метод Краскела-Уоллиса с поправкой DSCF для множественных сравнений

Рисунок 4 – Уровень ИЛ-17 в моче и количество Treg клеток в ткани почки при гломерулопатиях

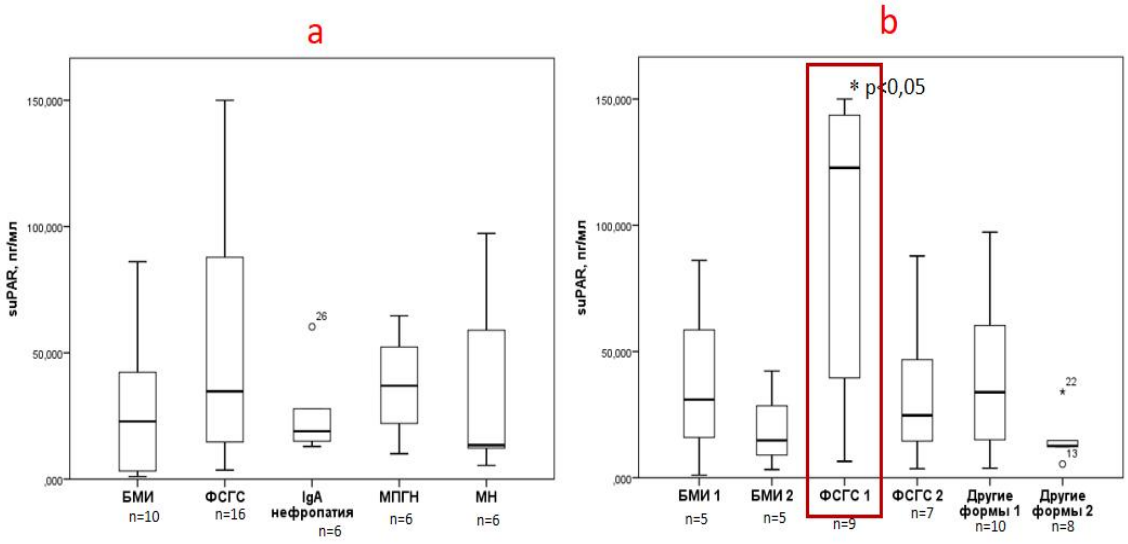
Уровень растворимого рецептора активатора плазминогена урокиназного типа (suPAR) в сыворотке крови больных хроническим гломерулонефритом

Уровень циркулирующего suPAR как предполагаемого фактора проницаемости, повреждающего подоциты, был изучен в сыворотке крови обследованных нами больных. Не было выявлено достоверных различий по уровню suPAR в зависимости от морфологического

варианта гломерулопатии/ХГН, отмечалась лишь тенденция к повышению suPAR у больных ФСГС (Рисунок 5a).

Однако при исключении вторичных форм ФСГС и разделении общей группы на подгруппы 1) до и 2) после назначения иммуносупрессивной терапии, достоверно более высокие концентрации suPAR в сыворотке крови выявлены у больных ФСГС до начала иммуносупрессивной терапии (ИСТ). Напротив, во второй подгруппе больных ФСГС, которые уже начали получать ИСТ, уровень suPAR в сыворотке был сопоставим с таковым при остальных гломерулопатиях (Рисунок 5b, Таблица 3).

Не было установлено достоверных корреляций уровня suPAR в сыворотке с суточной протеинурией (Rs = -0,114, p = 0,51), креатинином сыворотки/рСКФ$_{CKD-EPI}$ (Rs = 0,032, p = 0,847 и Rs = -0,054, p = 0,747 соответственно), наличием артериальной гипертензии (Rs = 0,015, p = 0,926), процентом склерозированных клубочков (Rs = 0,364, p = 0,07) или выраженностью тубулоинтерстициальнного фиброза в ткани почки (Rs = -0,189, p = 0,517).



**p<0,05 Метод Краскела-Уоллиса с поправкой DSCF для попарных сравнений*

Рисунок 5 – Уровень suPAR в сыворотке крови больных различными гломерулопатиями

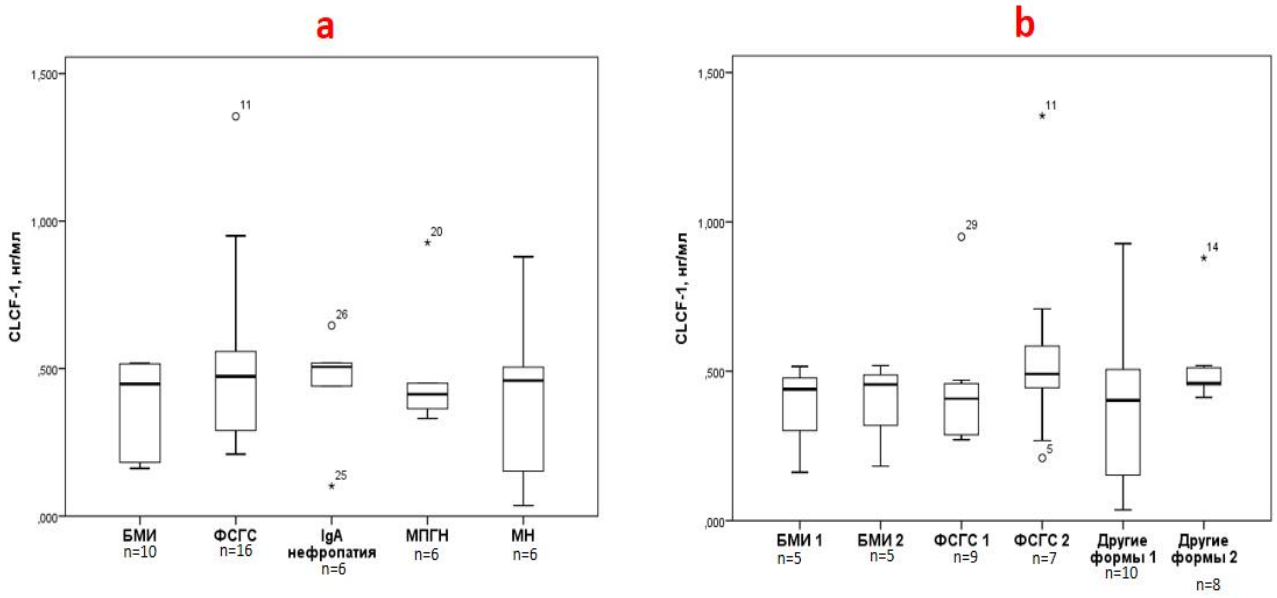
Таблица 3 – Статистические различия по уровню suPAR в сыворотке в группах больных гломерулопатиями до и после назначения иммуносупрессивной терапии

Морфологические варианты гломерулопатий/ХГН		p
ФСГС 1 122,75 [31,25 – 145,2] пг/мл (n=9) vs	БМИ 1 30,97 [1,04 – 86,09] пг/мл (n=5)	0,011
	БМИ 2 14,79 [3,24 – 42,29] пг/мл (n=5)	0,036
	ФСГС 2 24,73 [14,33-58,82] пг/мл (n=7)	0,011
	Другие формы 1 (МН, IgA нефропатия, МПГН), 39,87 [16,99 – 62,65] пг/мл (n=10)	0,030
	Другие формы 2 (МН, IgA нефропатия, МПГН), 12,59 [10,54 – 19,53] пг/мл (n=8)	0,003

Уровень кардиотрофин-подобного фактора-1 (CLCF-1) в сыворотке крови у больных гломерулопатиями

Другим кандидатом на роль фактора проницаемости, который был выделен из сыворотки больных с возвратным ФСГС в трансплантированной почке, является член семейства интерлейкина-6 CLCF-1, который, как показано в эксперименте, может повышать проницаемость гломерулярного фильтра для альбумина.

По результатам проведенного исследования достоверных различий уровня CLCF-1 в сыворотке крови больных с различными морфологическими вариантами нефрита не установлено (Рисунок 6a). При разделении на подгруппы по терапии было показано, что ИСТ также не влияла на уровень CLCF-1 в сыворотке крови больных с различными формами гломерулопатий (Рисунок 6b).



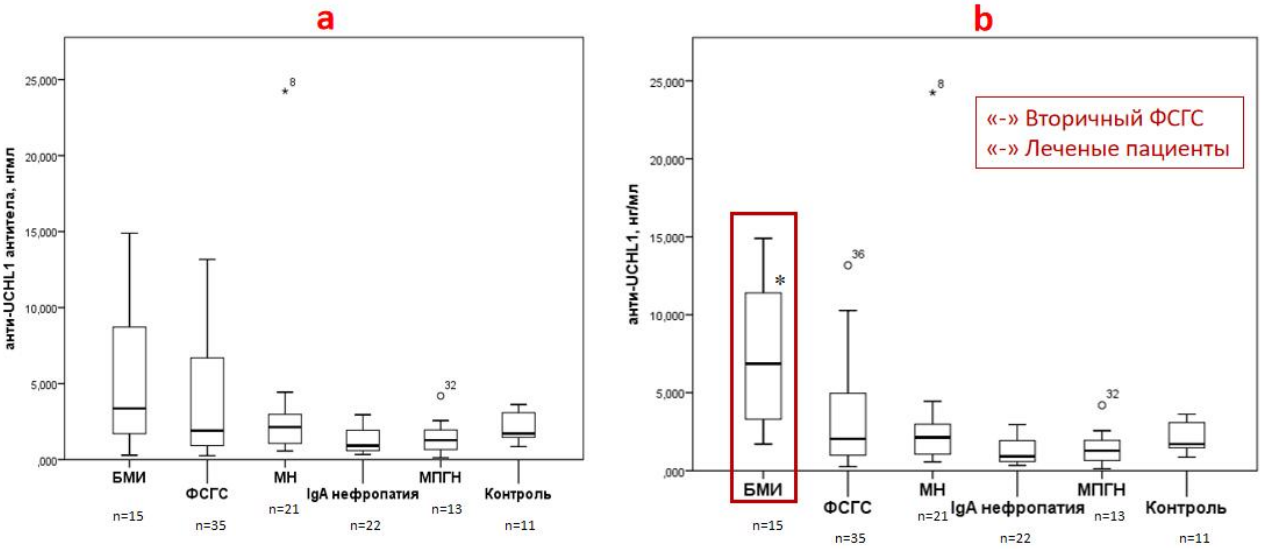
Статистически значимых различий по методу Краскела-Уоллиса между группами не выявлено

Рисунок 6 – Уровень CLCF-1 в сыворотке крови у больных гломерулопатиями

Наблюдалась прямая корреляция уровня CLCF-1 в сыворотке с протеинурией (Rs = 0,397; p = 0,015). Кроме того, получены достоверные корреляции между уровнем CLCF-1, триглицеридами сыворотки (Rs = 0,475; p = 0,003), липопротеинами очень низкой плотности (Rs = 0,467, p = 0,045) и обратная корреляция - с липопротеинами высокой плотности (Rs = -0,599, p = 0,031). Учитывая тот факт, что CLCF-1 связывается с липопротеинами низкой и очень низкой плотности в сыворотке крови и в составе комплексов с липидами увеличивает свою активность, CLCF-1 в связи с липидами может оказывать повреждающий эффект на подоциты независимо от концентрации в сыворотке крови.

Уровень антител к убиквитин-С-концевой гидролазе L1 (анти-UCH-L1) у больных гломерулопатиями

В общей группе обследованных больных прослеживается тенденция к увеличению уровня анти-UCH-L1 антител у больных БМИ и ФСГС (Рисунок 7a). При исключении больных со вторичным ФСГС и уже получающих ИСТ, различия стали статистически значимыми в группе больных с болезнью минимальных изменений (Рисунок 7b).



*$p<0,05$ *Метод Краскела-Уоллиса с поправкой DSCF для попарных сравнений*

Рисунок 7 – Уровень анти-UCH-L1 антител у больных гломерулопатиями

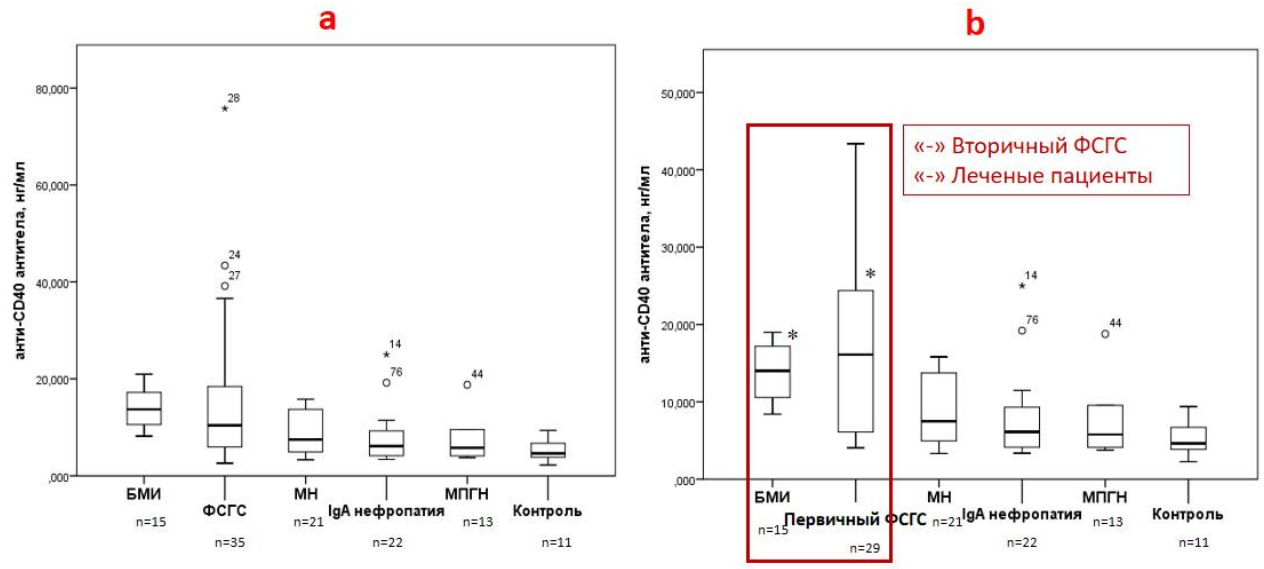
Не было обнаружено достоверных корреляций между уровнем анти-UCH-L1 антител в сыворотке крови и показателем суточной протеинурии (Rs = 0,014, p = 0,906), альбумина сыворотки (Rs = -0,196, p = 0,160), систолического и диастолического артериального давления (Rs = -0,166, p = 0,293 и Rs = 0,183, p = 0,286, соответственно), процентом склерозированных клубочков (Rs = -0,102, p = 0,425) или выраженностью тубулоинтерстициального фиброза (Rs = -0,187, p = 0,142), однако была выявлена слабая корреляция между уровнем анти-UCH-L1 антител в сыворотке крови и показателями почечной дисфункции – креатинина и $рСКФ_{CKD\text{-}EPI}$ (Rs = -0,376, p = 0,00 / Rs = 0,318, p = 0,007 соответственно).

Уровень анти-CD40 антител в сыворотке крови у больных гломерулопатиями

В общей группе обследованных больных отмечалась тенденция к увеличению анти-CD40 антител у больных БМИ и ФСГС (Рисунок 8a). Учитывая неоднородность группы больных ФСГС и БМИ, был использован прежний подход с исключением вторичных форм ФСГС и больных БМИ/ФСГС, уже получающих иммуносупрессивную терапию.

Медиана уровня анти-CD40 антител стала более высокой в группе ФСГС, по сравнению с другими вариантами гломерулопатий/ХГН, но сопоставимой с медианой в группе БМИ, что

говорит о существовании общего механизма повреждения. Известно, что анти-CD40антитела многократно усиливают эффект suPAR в формировании подоцитарной дисфункции (Рисунок 8b).



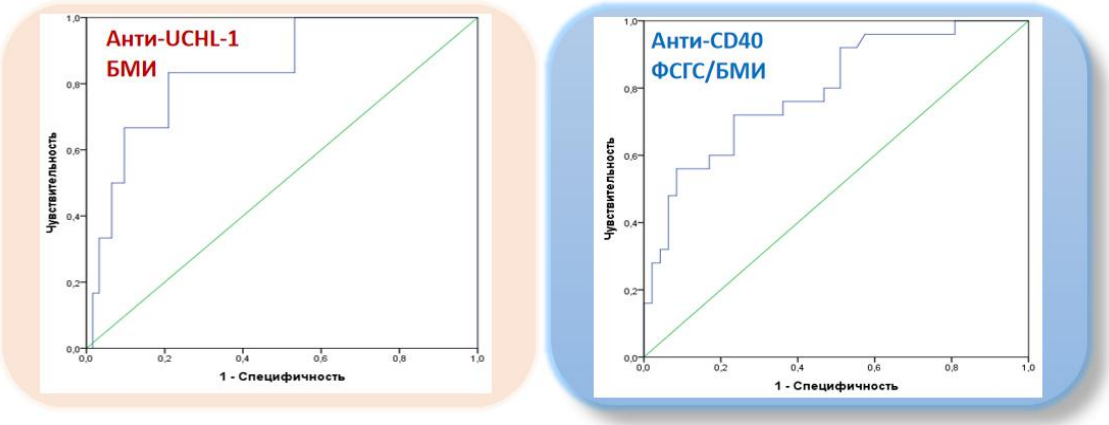
∗ p<0,05 БМИ/ФСГС vs остальные группы, метод множественных сравнений Краскела-Уоллиса с поправкой DSCF для попарных сравнений

Рисунок 8 – Уровень анти-CD40 антител в сыворотке крови у больных гломерулопатиями

Не было установлено достоверных корреляций уровня анти-CD40 антител в сыворотке с креатинином сыворотки/рСКФ$_{CKD-EPI}$ (Rs = -0,089, p = 0,443 и Rs = 0,124, p = 0,283, соответственно), процентом склерозированных клубочков (Rs = -0,051, p = 0,679) или выраженностью тубулоинтерстициальнного фиброза (Rs = 0,048, p = 0,7), выявлена корреляция слабой силы с суточной протеинурией (Rs = 0,282, p = 0,013) и альбумином сыворотки крови (Rs = -0,275, p = 0,016).

Информативность определения анти-UCHL1 и анти-CD40 антител в сыворотке крови для диагностики ФСГС и БМИ

По данным ROC анализа и расчете площади под кривой уровень анти-UCH-L1 антител обладал высокой информативностью для диагностики БМИ (чувствительность 83,3% и специфичность 79%), а анти-CD40 антител – для диагностики обоих форм подоцитопатий (БМИ и ФСГС) (чувствительность 72% и специфичность 76,6%) (Рисунок 9). Установленные различия могут быть использованы для дифференциальной диагностики БМИ и ФСГС с МН и пролиферативными формами нефрита (IgA нефропатией и МПГН) в клинической практике.

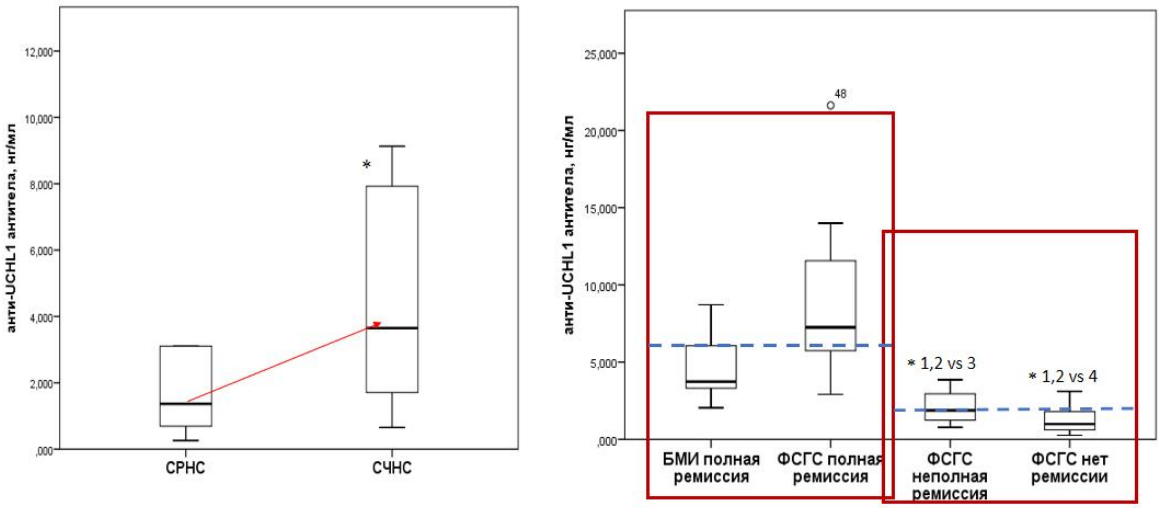


	Показатель	AUC [ДИ95%]	Чувствительность, %	Специфичность, %	p
БМИ	антиUCHL-1 антитела	0,841 [0,687-0,996]	83,3	79,0	0,006
БМИ/ФСГС	Анти-CD40 антитела	0,794 [0,686-0,903]	72,0	76,6	0,001

Рисунок 9 – Информативность анти-UCHL1 и анти-CD40 антител для диагностики ФСГС и БМИ

Ответ на терапию стероидами в зависимости от исходного уровня анти-UCH-L1 и анти-CD40 антител в сыворотке крови больных ФСГС/БМИ

В объединенной группе больных с первичными подоцитопатиями ФСГС и БМИ ответ на проводимую терапию стероидами был прослежен в зависимости от исходного уровня анти-UCH-L1 антител, уровень антител оказался достоверно выше у больных со стероид-чувствительным, чем у больных со стероид-резистентным НС (Рисунок 10).

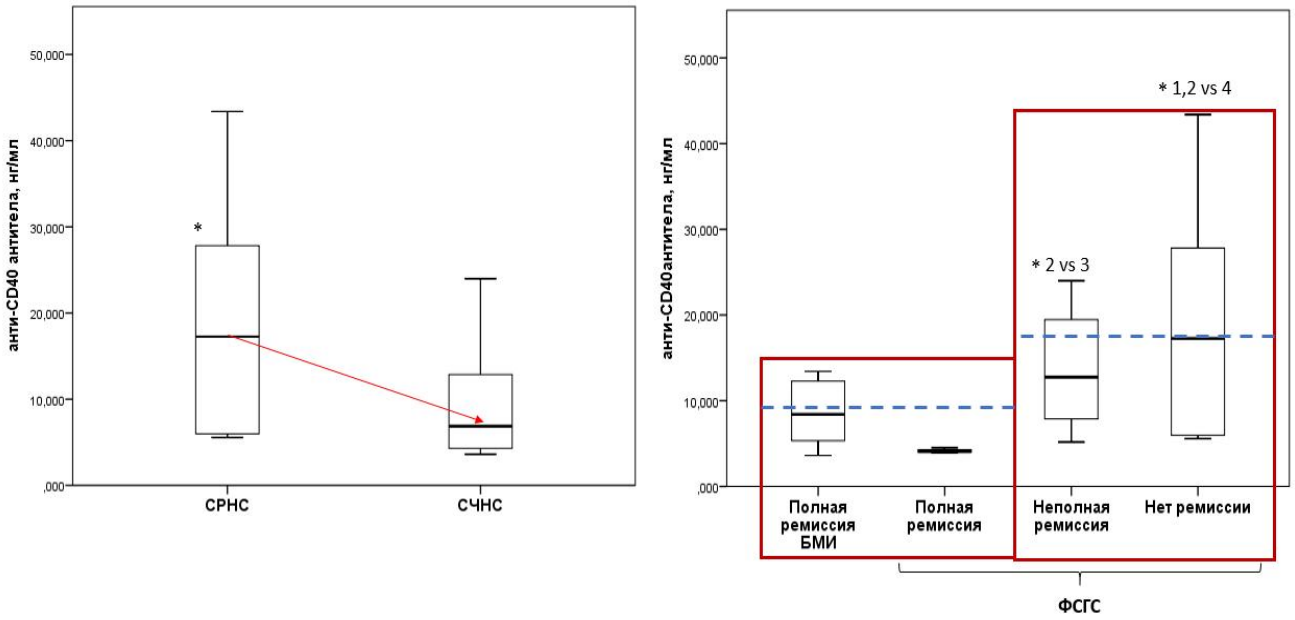


∗p<0,05 СРНС (стероид-резистентный НС) vs СЧНС (стероид-чувствительный НС), метод Манна-Уитни, метод Краскела –Уоллиса с поправкой DSCF - для множественных сравнений
Рисунок 10 – Ответ на терапию стероидами в зависимости от исходного уровня анти-UCH-L1 антител в сыворотке крови больных ФСГС/БМИ

В случае анти-CD40 антител была выявлена обратная зависимость: у больных, у которых достигнута полная ремиссия заболевания, обнаружены исходно более низкие титры анти-CD40 антител в сыворотке крови (Рисунок 10).

Таким образом, по характеру изменения уровня антител и ответу на терапию можно выделить две подгруппы: 1) первая включала больных со стероид-чувствительными формами БМИ и ФСГС; 2) вторая состояла из больных со стероид-резистентным ФСГС или неполным ответом на терапию стероидами. Первая подгруппа характеризуется более высоким уровнем анти-UCH-L1 антител и более низким уровнем анти-CD40 антител. Напротив, во второй подгруппе уровень анти-UCH-L1 антител в сыворотке крови был достоверно ниже, в то время как анти-CD40 антитела были значимо выше, чем в группах сравнения (Рисунки 10 и 11).

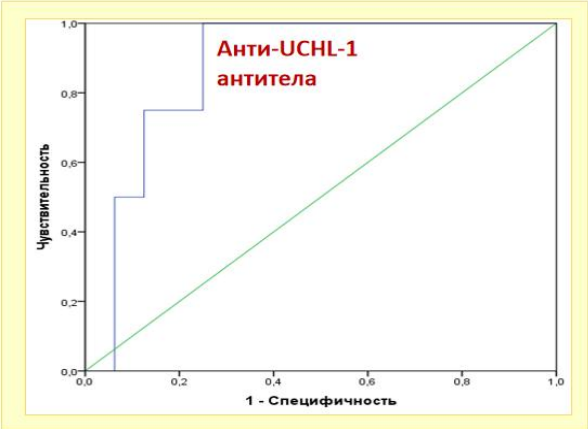
Полученные данные могут отражать разные механизмы, лежащие в основе формирования чувствительной и резистентной к терапии формы ФСГС, при этом стероид-чувствительная форма ФСГС по спектру анти-UCH-L1 и анти-CD40 антител приближается к БМИ. В то же время высокие концентрации анти-CD40 антител усиливают действие suPAR в области прикрепления подоцитов к гломерулярной базальной мембране и вызывают тяжелое пролонгированное повреждение подоцитов, ведущее к развитию стероид-резистентности у больных ФСГС.

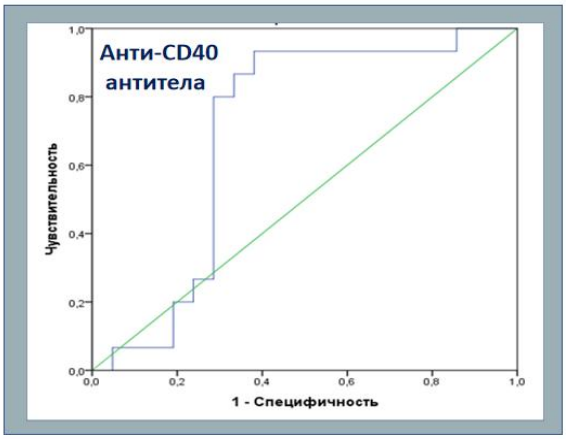


⁎p<0,05 СРНС (стероид-резистентный НС) vs СЧНС (стероид-чувствительный НС), метод Манна-Уитни, метод Краскела –Уоллиса с поправкой DSCF - для множественных сравнений
Рисунок 11 – Ответ на терапию стероидами в зависимости от исходного уровня анти-CD40 антител в сыворотке крови больных ФСГС/БМИ

Информативность определения анти-UCH-L1 и анти-CD40 антител в сыворотке крови для прогнозирования ответа на терапию стероидами у больных ФСГС/БМИ

По данным ROC анализа и расчете площади под кривой анти-UCHL-1 и анти-CD40 антитела сыворотки обладали высокой информативностью (чувствительностью и специфичностью) для прогнозирования ответа на терапию стероидами у больных ФСГС/БМИ (Рисунок 12).





Показатель	AUC [ДИ95%]	Cut-off	Чувствительность, %	Специфичность, %	p
АнтиUCHL-1 антитела	0,875 [0,718-0,999]	6,44 нг/мл	75,0	87,5	0,023
Анти-CD40 антитела	0,698 [0,515 -0,881]	9,65 нг/мл	80,0	71,4	0,045

Рисунок 12 – Информативность анти-UCH-L1 и анти-CD40 антител для прогнозирования ответа на терапию стероидами у больных ФСГС/БМИ

При проведении логистического регрессионного анализа наиболее значимыми факторами, которые определяли ответ на терапию стероидами, оказались высокий уровень анти-UCH-L1 антител и низкий уровень альбумина сыворотки. Вероятность достижения полной ремиссии повышалась почти в 1,625 [1,027-2,570] раза при уровне анти-UCH-L1 антител в сыворотке крови более 6,44 нг/мл (Рисунок 13).

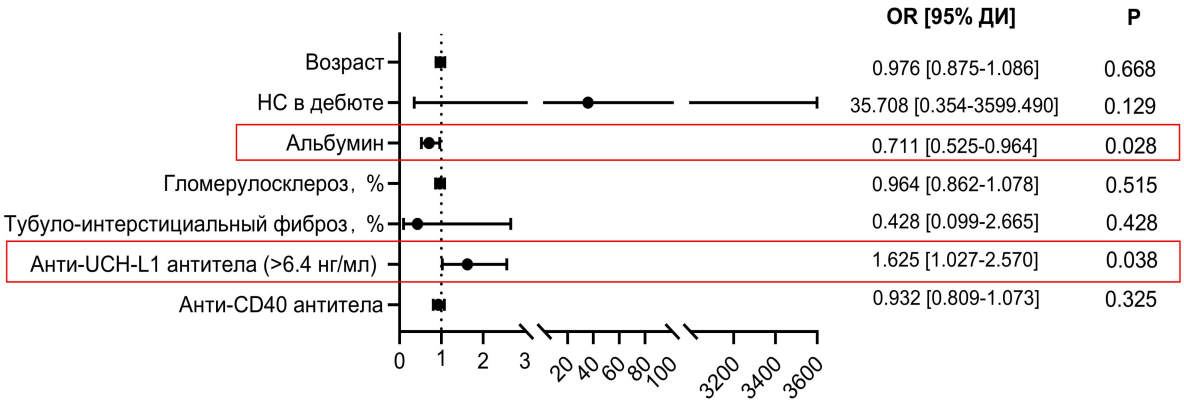


Рисунок 13 – Факторы, определяющие ответ на терапию ФСГС/БМИ

ВЫВОДЫ

1. Частота выявления первичных подоцитопатий (ФСГС, МН и БМИ) среди больных с протеинурией и НС с 2007 по 2021 год составила 48,5%: у 10% диагностирован ФСГС, у 16,6% - БМИ, у 22% - МН; при этом последние 5 лет выявляется тенденция к увеличению числа больных БМИ и ФСГС с 35 до 50% (в 1,4 раза).

2. У больных первичным ФСГС и БМИ отмечается достоверное повышение уровня ИЛ-17 в моче, уменьшение количества Трег клеток в ткани почки по сравнению с другими морфологическими формами гломерулонефрита, что свидетельствует о развитии дисбаланса Th17/Трег клеток с гиперпродукцией интерлейкина-17 и подавлением Т рег.

3. Достоверно более высокий уровень анти-UCH-L1 антител определяется у больных БМИ, а анти-CD40 антител – у больных ФСГС и БМИ, чем у больных МН и пролиферативными формами гломерулопатий, что отражает активацию В клеток и продукцию ими специфических антиподоцитарных антител при БМИ/ФСГС; уровень анти-CD40 антител прямо коррелирует с показателями протеинурии и альбумина сыворотки, а анти-UCHL-1 антител – с рСКФ; достоверных корреляций с выраженностью гломерулосклероза и интерстициального фиброза не выявлено.

4. У больных первичным ФСГС обнаружено значимое повышение уровня suPAR в сыворотке крови по сравнению с другими группами больных гломерулопатиями, что наряду с высокими показателями анти-CD40 антител в сыворотке крови свидетельствует о более тяжелом повреждении подоцитов и определяет резистентность к терапии стероидами; оценка уровня CLCF-1 в сыворотке крови не имеет клинического значения для диагностики подоцитопатий.

5. Исходный уровень анти-UCH-L1 антител и анти-CD40 антител у больных БМИ и первичным ФСГС позволяет определять ответ на терапию стероидами. Быстрое достижение полной ремиссии нефротического синдрома при назначении стероидов можно прогнозировать при повышении уровня анти-UCH-L1 антител в сыворотке крови более 6,44 нг/мл ОШ 1,625 [95%ДИ 1,027-2,570], AUC= 0,875 [0,718-0,999], $p < 0,023$, и при уровне анти-CD40 антител не более 9,65 нг/мл (AUC = 0,698 [0,515-0,881], $p < 0,045$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение уровня suPAR, анти-UCH-L1 антител и анти-CD40 антител в сыворотке крови можно рекомендовать больным с НС для дифференциальной диагностики первичных подоцитопатий – ФСГС, БМИ и МН.

2. У больных с НС диагноз БМИ можно предполагать при обнаружении в сыворотке крови анти-UCH-L1 антител в концентрации более 3,21 нг/мл (чувствительность 83,3%, специфичность 79,0%); диагноз первичного ФСГС или БМИ – при повышении уровня анти-

CD40 антител в своротке крови более 9,74 нг/мл (чувствительность 72,0%, специфичность 76,6%).

3. Высокую вероятность ответа на терапию стероидами при БМИ и первичном ФСГС можно прогнозировать при уровне анти-UCH-L1 антител выше 6,44 нг/мл (чувствительность 75%, специфичность 87,5%), и анти-CD40 антител – не более 9,65 нг/мл (чувствительность 80%, специфичность 71,4%).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Н.В. Чеботарева, А.М. Кучиева, О.А. Ли, С.В. Рощупкина, В. Цао. Опыт применения ритуксимаба при резистентном к терапии фокально-сегментарном гломерулосклерозе у взрослых: серия наблюдений и краткий обзор литературы / **Нефрология**. – 2020. – 24(2). – С.52-59./DOI: 10.36485/1561-6274-2020-24-2-52-59 [Scopus]
2. Chebotareva N.V., Vinogradov A.A., Gindis A.A., Bobkova I.N., Cao W., Lysenko L.V. The balance of proinflammatory cytokines and Treg cells in chronic glomerulonephritis / **Therapeutic archive** –2020. –92(6). –P.46-52./DOI:10.26442/00403660.2020.06.000671 [Scopus]
3. Natalia Chebotareva, Anatoliy Vinogradov, Alla Gindis, Wenjing Cao. Interleukin-17 in urine and serum of patients with nephritis/ International Journal of Rheumatic Diseases. – 2020. – 23(5). – P. 706-706. /DOI: 10.1111/1756-185X.13844 [Scopus]
4. Chebotareva N, Vinogradov A, Cao V, Gindis A, Berns A, Alentov I, Sergeev N. Serum levels of plasminogen activator urokinase receptor and cardiotrophin-like cytokine factor 1 in patients with nephrotic syndrome/ **Clinical Nephrology**. – 2021. – 97(2). – P. 103-110./DOI: 10.5414/cn110514 [Scopus]
5. N. Chebotareva, A. Vinogradov, V. Cao, A. Gindis, A. Berns, Serum levels of plasminogen activator urokinase receptor and cardiotrophin-like cytokine factor 1 in patients with nephrotic syndrome, Kidney International Reports, volume 6, issue 4, supplement, s196, The World Congress of Nephrology 2021 (WCN'21), Монреаль, Канада, 15-18 апрель 2021 (он-лайн). DOI: https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.03.478
6. Natalia Chebotareva, Anatoliy Vinogradov, Wenjing Cao, Alla Gindis, Igor Alentov, Natalia Sergeeva. Serum levels of plasminogen activator urokinase receptor and cardiotrophin-like cytokine factor 1in patients with nephrotic syndrome, Nephrology Dialysis Transplantation, Volume 36, Issue Supplement1, 58th ERA-EDTA Congress Berlin & Virtual, Берлин, Германия, 05-08 июня, 2021 (он-лайн). Congress Abstracts gfab092.0088, https://doi.org/10.1093/ndt/gfab092.0088
7. Natalia Chebotareva, Anatoliy Vinogradov, Wenjing Cao. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1

(UCHL1) Antibody Production in Nephrotic Syndrome, Nephrology Dialysis Transplantation, Volume 37, Issue Supplement_3, May 2022. 59th ERA Congress, Париж, Франция, 19-22 мая 2022 (он-лайн). Congress Abstracts gfac067.033, https://doi.org/10.1093/ndt/gfac067.033

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Анти-UCH-L1 антитела	–	антитела к убиквитин-С-концевой гидролазе L1
БМИ	–	болезнь минимальных изменений
ГБМ	–	гломерулярная базальная мембрана
ИЛ-17	–	интерлейкин-17
ИСТ	–	иммуносупрессивная терапия
ИФА	–	иммуноферментный анализ
МН	–	мембранозная нефропатия
МПГН	–	мембранопролиферативный гломерулонефрит
НС	–	нефротический синдром
$рСКФ_{CKD-EPI}$	–	расчётная скорость клубочковой фильтрации по формуле CKD-EPI
СПУ	–	суточная протеинурия
ТИФ	–	тубуло-интерстициальный фиброз
Трег	–	регуляторные Т-лимфоциты
ФНО	–	фактор некроза опухолей
ФСГС	–	фокально-сегментарный гломерулосклероз
ХГН	–	хронический гломерулонефрит
ЦФП	–	циркулирующий фактор проницаемости
CLCF-1	–	кардиотрофин-подобный фактор 1
FoxP3	–	фактор транскрипции регуляторных Т-лимфоцитов
suPAR	–	растворимый рецептор активатора плазминогена урокиназного типа
Th17	–	Т-хелперы 17