

Министерство здравоохранения Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени
И.М.Сеченова (Сеченовский Университет)

На правах рукописи

Чеботарева Наталья Викторовна

НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИИ ПОДОЦИТОВ И МЕХАНИЗМОВ
САМОЗАЩИТЫ ПОЧКИ: ЗНАЧЕНИЕ В ОЦЕНКЕ АКТИВНОСТИ И
ПРОГНОЗА ХРОНИЧЕСКОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

14.01.29 – «Нефрология»

14.01.04 – «Внутренние болезни»

Диссертация
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

научные консультанты

доктор медицинский наук, профессор

Бобкова Ирина Николаевна

доктор медицинский наук, профессор

Лысенко Лидия Владимировна

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Подоцитарное повреждение. Маркеры подоцитарного повреждения при хроническом гломерулонефрите.....	16
1.1.2. Строение и функция фильтрационного барьера.....	17
1.1.3. Ответ подоцитов на повреждение. Подоцитурия.....	17
1.1.4. Нефринурия.....	21
1.1.5. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) при ХГН.....	22
1.2. Механизмы подоцитопении – основной детерминанты гломерулосклероза.....	25
1.3. Факторы повреждения клубочков почек при ХГН.....	28
1.3.1. Моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1).....	28
1.3.2. Интерлейкин-6.....	31
1.3.3. Матриксные металлопротеиназы (ММП).....	32
1.4. «Система самозащиты почки».....	35
1.4.1. Внеклеточная защита: ингибиторы воспалительных медиаторов.....	37
1.4.1.1 Антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra).....	38
1.4.1.2. Инактиваторы лейкоцитов и резидентных клеток: ИЛ-10.....	42
1.4.1.3. ИЛ-10 в лечении экспериментального гломерулонефрита.....	44
1.4.1.4. Роль регуляторных иммунных клеток в механизмах «самозащиты почки».....	46
1.4.2. Внутриклеточная защита: белки теплового шока.....	48
1.4.2.1. Белки теплового шока 27.....	49
1.4.2.2. Белки теплового шока 70.....	52
1.4.2.3. Роль БТШ 70 в Т клеточной регуляции хронического воспаления.....	55
1.4.3. Стратегии, направленные на усиление «системы самозащиты почки».....	58

1.5. Заключение.....	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	69
2.1. Характеристика обследованных больных.....	69
2.2. Специальные методы обследования.....	72
2.2.1. Определение экскреции молекулярных факторов повреждения и «системы самозащиты почки» в моче с помощью ELISA.....	72
2.2.2. Определение подоцитов и их фрагментов в моче.....	73
2.2.3. Определение антител к БТШ-70 в сыворотке крови.....	75
2.2.4. Определение экспрессии факторов «системы самозащиты» с помощью иммуногистохимического метода в ткани почки.....	75
2.3. Методы оценки антипротеинурического действия препарата, блокирующего эффекты МСР-1, у больных ХГН.....	77
2.4. Методы статистической обработки.....	81
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	82
3.1. Показатели подоцитарного повреждения у больных ХГН.....	82
3.1.1. Экскреция нефрина с мочой больных ХГН.....	82
3.1.2. Уровень подоцитурии у больных ХГН.....	87
3.1.3.Уровень белка теплового шока 27 в моче больных ХГН.....	90
3.1.4. Соотношение показателей подоцитарного повреждения: нефринурии, подоцитурии и БТШ 27 в моче больных ХГН.....	94
3.2. Значение воспалительных цитокинов как факторов повреждения у больных ХГН.....	95
3.2.1. Уровень моноцитарного хемотаксического протеина-1 и	

интерлейкина-6 в моче больных ХГН.....	95
3.3. Экскреция факторов апоптоза/выживаемости подоцитов у больных ХГН.....	99
3.4. Результаты иммуногистохимического метода оценки подоцитопении у больных хроническим гломерулонефритом.....	103
3.5. Исследование факторов «системы самозащиты почки» у больных ХГН.....	108
3.5.1. Исследование белка теплового шока 70 в моче и ткани почки и уровня антител к БТШ-70 в сыворотке крови больных ХГН.....	108
3.5.2. Исследование БТШ-70 в моче больных ХГН.....	108
3.5.3 Исследование БТШ-70 в ткани почек больных ХГН.....	110
3.5.4 Исследование антител к БТШ-70 в сыворотке крови больных ХГН.....	114
3.5.5 Исследование противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-1ra) в моче и Т-регуляторных (противовоспалительных) клеток в биоптатах почечной ткани больных ХГН.....	116
3.6 Исследование матриксных металлопротеиназ (-2 и -9) и ТИМП-2 в моче больных ХГН.....	120
3.7 Прогностическое значение исследованных показателей	124
3.8 Результаты применения препарата, блокирующего эффекты моноцитарного хемотаксического протеина -1 (Пептид X МСР)5-76).....	133
3.9 Клинические примеры.....	139
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	151
Глава 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	163
ВЫВОДЫ.....	166
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	169
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	170
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	172

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Проблема хронического гломерулонефрита (ХГН) относится к одной из кардинальных проблем нефрологии и внутренней медицины в целом в связи с высокой распространенностью поражения почек среди населения, в том числе молодой, трудоспособной его части, серьезностью прогноза и недостаточной разработанностью вопросов патогенеза и, следовательно, лечения.

Центральное значение в изучении патогенеза ХГН имеет расшифровка механизмов реализации процессов воспаления в почке как основы активности ХГН, наиболее информативным клиническим признаком которого по-прежнему считают протеинурию и нефротический синдром (НС).

Согласно современным представлениям универсальным механизмом развития протеинурии является дисфункция подоцита - ключевого компонента гломерулярного барьера. Уточнены многие клеточно-молекулярные изменения подоцитов, лежащие в основе массивной протеинурии/нефротического синдрома, и роль подоцитопении в качестве важной детерминанты формирования гломерулосклероза. Так, в эксперименте на животных моделях гломерулонефрита и в культуре гломерулярных клеток показано, что подоцитарное повреждение сопровождается распластыванием подоцитов, их апоптозом, отделением от БМК и слущиванием в мочу с появлением в моче целых клеток (подоцитурия) и структурных подоцитарных белков. В результате происходит потеря общей массы подоцитов в клубочке, что при ограниченной способности их к пролиферации ведет к развитию подоцитопении и склероза [154, 156, 242]. По данным отдельных экспериментальных исследований уровень экскреции с мочой нефрина (главного белкового компонента щелевой диафрагмы подоцитов) и подокаликсина (поверхностного белка ножек подоцитов) пропорционален степени гломерулярного повреждения, являясь одним из ранних маркеров подоцитарной дисфункции [110,111,112, 222, 269].

Повреждение подоцитов при ХГН сопровождается активацией противодействующих ему механизмов, обозначаемых как «система самозащиты» почки». Несостоятельность этих механизмов, в первую очередь нарушение функции белков теплового шока (БТШ-27, БТШ-70), выполняющих в норме функцию поддержания белковой структуры подоцитов и других клеток, а также обеспечения их противовоспалительного потенциала, во многом определяет темпы прогрессирования ХГН [284,307]. На экспериментальных моделях гломерулонефрита показано, что нарушения «системы самозащиты почки» тесно связаны с изменением соотношения провоспалительных (ИЛ-6, МСР-1) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-1ra), матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, а также факторов апоптоза/ выживаемости подоцита (сосудистый эндотелиальный фактор роста -VEGF, каспаза-9).

Подоцит является связующим звеном и в реакциях фиброзного ремоделирования тубуло-интерстиция, не только за счет нефротоксического действия протеинурии, но также через приобретение тубулярными эпителиальными клетками провоспалительного и профиброгенного фенотипа. Так, установлено, что величина тубуло-интерстициального фиброза (ТИФ более 20% при измерении методом морфометрии) в большей степени, чем выраженность гломерулосклероза, коррелирует с уровнем креатинина сыворотки крови и скоростью клубочковой фильтрации [154,156].

Патогенетическая роль протеинурии при ХГН в активации факторов повреждения и механизмов «системы самозащиты почки» в клинических условиях изучена недостаточно. В то же время расшифровка этих нарушений на основе изучения биомаркеров в ткани почки, сыворотке крови и моче на разных этапах течения ХГН имеет значение не только для понимания механизмов его прогрессирования, но и для разработки таргетного воздействия на эти механизмы с целью торможения развития почечной недостаточности.

Степень разработанности темы

Изучение роли подоцитов в механизмах развития протеинурии и прогрессирования ХГН является предметом пристального внимания научных исследований в настоящее время. Проводится поиск наиболее информативных «биомаркеров», определение которых позволит мониторировать выраженность подоцитарного повреждения и структурно-функциональных нарушений в почке. Существенный вклад в изучение данной проблемы внесли группы исследователей из Японии [110,111,112, 222, 269], которые показали, что мере нарастания активности нефрита увеличивается экскреция с мочой подоцитов и их структурных белков (нефрина, подоцина, подокаликсина). В работах Vogelmann SU у больных с заболеваниями почек изучались специфические маркеры подоцитов в моче (подокаликсин, синаптоподин, WT-1) [320]. В исследованиях Kriz W. и соавт. 1994 и 1998гг. продемонстрировано, что потеря (более 40%) подоцитов в кубочках почек приводит к необратимому повреждению гломерулярного фильтра и запускает процессы гломерулосклероза [154,157].

Еще в 1999г. Kitamura M. сформулировал концепцию «самозащиты почки» согласно которой в ткани почки существует многоуровневая система, противодействующая повреждению [145]. Универсальными защитными факторами являются белки теплового шока. В настоящее время роль БТШ при различных заболеваниях почек, в первую очередь при ХГН изучена недостаточно. Большая часть исследований касается изучения экспрессии БТШ в ткани почки при остром почечном повреждении [Harrison 2008, Zang 2008, Guo 2014]. Имеются лишь единичные работы, посвященные изучению экспрессии БТШ70 в ткани почки больных ХГН [307, 315] - Venkataseshan 1996, Tsagalis 2006, однако оценка экскреции БТШ70 с мочой, уровня антител к БТШ70 в сыворотке крови у больных ХГН ранее не проводилась. В значительной части эти исследования посвящены количественному определению подоцитурии и уровня подоцитарных белков в моче у больных различными нефропатиями и включали небольшое количество больных ХГН. При этом не оценивалось клиническое значение этих

показателей - влияние на характер течения нефрита, ответ на иммуносупрессивную терапию, прогноз, а также их взаимодействие с факторами «самозащиты почки» у больных ХГН.

Цель и задачи исследования

Охарактеризовать нарушения функции подоцитов и системы «самозащиты почки» у больных ХГН на основе изучения молекулярно-клеточных медиаторов, уточнить их значение для определения активности/прогрессирования ХГН и как возможных объектов таргетной терапии.

У больных ХГН на разных этапах его течения:

1. Оценить нарушение функции подоцитов – центрального звена гломерулярного фильтрационного барьера, по величине подоцитурии, уровню экскреции с мочой белка щелевой диафрагмы нефрина и ассоциированного с актиновым цитоскелетом подоцитов белка теплового шока (БТШ) 27;
2. Изучить в сопоставлении с нефринурией и подоцитурией интенсивность процесса выживаемости/апоптоза подоцитов по уровню экскреции с мочой сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и каспазы-9; а также выраженности подоцитопении, оцененной в клубочках морфометрическим методом;
3. Выявить нарушения в «системе самозащиты почки» на основании исследования одного из ее компонентов – белка теплового шока (БТШ)70 в моче и почечной ткани наряду с измерением уровня антител к БТШ70 в сыворотке крови; оценить значение этих показателей в реализации активности/прогрессирования ХГН;
4. Уточнить особенности функционирования «системы самозащиты почки» по соотношению уровня экскреции с мочой противовоспалительных факторов – ИЛ-1 α , ТИМП-2, ИЛ-10, количества в клеточных интерстициальных

инфильтратах почки регуляторных Т клеток и уровня в моче провоспалительных факторов - МСР-1, ИЛ-6, металлопротеиназы-2;

5. Определить информативность изученных показателей повреждения подоцитов и «системы самозащиты почки» для прогнозирования эффективности иммуносупрессивной терапии; изучить эффект применения у больных с ХГН конкурентного антагониста МСР-1, таргетно воздействующего на подоцитарные механизмы.

Научная новизна работы

1. Впервые в клинических условиях у больных активными протеинурическими формами ХГН была проведена комплексная оценка подоцитарной дисфункции на основании изучения подоцитарных маркеров (нефринурии, подоцитурии), степени апоптоза по уровню экскреции с мочой каспазы-9 и фактора выживаемости подоцитов и эндотелия клубочков (VEGF), получены прямые достоверные корреляции этих показателей с выраженностью протеинурии/НС, почечной недостаточности, а также тяжестью выявляемой при морфометрии подоцитопении – основного фактора прогрессирования гломерулосклероза.
2. Впервые в клинической практике в ткани почки, моче, сыворотке крови больных протеинурическими формами ХГН изучен широкий спектр факторов «системы самозащиты почки» (белки теплового шока 27 и 70, противовоспалительные интерлейкин-10, антагонист рецептора к ИЛ-1, тканевой ингибитор металлопротеиназ) в сопоставлении с провоспалительными факторами (МСР-1, ИЛ-6, матриксные металлопротеиназы). Полученные результаты подтверждают важное значение недостаточности (истощения) протективного механизма в реализации активности/ прогрессирования ХГН.

3. Впервые у больных ХГН оценены внеклеточные протективные эффекты БТШ-70 по уровню антител к этому белку в сыворотке крови, а также количеству противовоспалительных Трег клеток в интерстиции почек и уровню ИЛ-10 в моче. Выявлен дефицит БТШ 70-опосредованного противовоспалительного звена «системы самозащиты почки» по мере нарастания НС и присоединения почечной недостаточности.
4. Подтверждена возможность использования показателей подоцитарного повреждения (величины нефринурии и подоцитурии), экспрессии антиапоптотического фактора VEGF с мочой, а также уровня антител к БТШ70 в сыворотке крови для оценки течения ХГН и прогноза эффективности терапии. Показано, что высокие показатели подоцитурии и нефринурии, низкие показатели VEGF в моче и антител к БТШ70 в сыворотке крови имеют неблагоприятное прогностическое значение, указывая на тяжесть повреждения подоцитов, подоцитопению, торпидность нефротического синдрома к проводимой стандартной иммуносупрессивной терапии и, следовательно, может служить основанием для усиления иммуносупрессивной терапии или применения антицитокиновых препаратов.
5. Получен первый в России опыт применения препарата (пептид X MСР-1), действие которого направлено на ингибирование эффектов MСР-1, в том числе на подоцитарную дисфункцию; у больных с активным течением ХГН с помощью этого препарата получен антипротеинурический эффект, что создает перспективу дальнейшей разработки антицитокиновых лекарственных средств с целью снижения протеинурии.

Теоретическая и практическая значимость

В клинических условиях на достаточно большом числе больных ХГН было подтверждено значение провоспалительных (MСР-1, ИЛ-6, каспазы-9,

металлопротеиназы-2 и -9) и противовоспалительных факторов (ИЛ-10, ИЛ-1 α , ТИМП, VEGF, количества Трег клеток в интерстиции, БТШ 27 и 70) в поддержании активности/прогрессирования ХГН.

В результате теоретически обоснованы и практически апробированы информативные диагностически неинвазивные тесты оценки иммунного воспаления в почке у больных ХГН для определения характера течения и эффективности лечения заболевания. Результаты этих тестов позволяет выделять среди пациентов с ХГН группу больных, нуждающихся в более стойкой и длительной иммуносупрессивной и противовоспалительной терапии.

Выявленный в настоящем исследовании антипротеинурический эффект ингибитора МСР-1 является предпосылкой для разработки методов воздействия на ключевые звенья подоцитарной дисфункции и «системы самозащиты почки» как нового направления таргетной терапии при ХГН.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У больных с активными формами хронического гломерулонефрита пропорционально степени клинической активности/тяжести заболевания выявляются признаки повреждения подоцитов, проявляющиеся отслоением от ГБМ и слущиванием в мочевое пространство целых клеток (подоцитурия), структурных белков подоцитов и щелевой межподоцитарной диафрагмы (белок теплового шока 27 и нефрин); показатели подоцитарного повреждения коррелируют между собой и выраженностью подоцитопении - важного фактора развития гломерулосклероза и прогрессирования почечной недостаточности.
2. При тяжелом течении активного ХГН с присоединением почечной недостаточности параллельно нарастанию показателей подоцитарного повреждения - нефринурии и подоцитурии - отмечается увеличение экскреции с мочой маркера апоптоза (каспазы-9) и снижение VEGF - фактора выживаемости, противостоящего апоптозу: отмечается

положительная корреляция уровня VEGF в моче с протеинурией и обратная - с уровнем креатинина сыворотки крови, что отражает преобладание процесса апоптоза при прогрессировании протеинурических форм ХГН.

3. У больных с активными протеинурическими формами ХГН важным фактором прогрессирования является недостаточность (истощение) механизмов «самозащиты» почки, о чем свидетельствует снижение уровня антител к основному протективному белку ткани почки БТШ-70, несмотря на компенсаторное повышение его экспрессии в ткани почки и экскреции с мочой, уменьшение количества индуцируемых БТШ70 противовоспалительных Трег клеток в интерстиции почки – основных продуцентов ИЛ-10; отмечается прямая корреляция этих показателей с величиной протеинурии и выраженностью почечной недостаточности. Функциональный дисбаланс в «системе самозащиты почки» нарастает по мере увеличения активности/тяжести ХГН, одновременно с увеличением провоспалительных (MCP-1, ИЛ-6 и металлопротеиназы-2) факторов отмечается резкое снижение противовоспалительных медиаторов (ИЛ-10, ИЛ-1 α и ТИМП-2) в моче, что указывает на роль этого механизма в прогрессировании заболевания.
4. Количественное определение в моче больных протеинурическими формами ХГН показателей подоцитарного повреждения и системы «самозащиты» почки может являться методом мониторинга активности/прогрессирования ХГН и эффективности иммуносупрессивной терапии - прогностически неблагоприятными факторами течения НС являются высокие показатели нефринурии и подоцитурии, низкий уровень антител к БТШ-70 в сыворотке крови и VEGF в моче, которые отражают несостоятельность механизмов «самозащиты» почки, в том числе на территории подоцитов. Применение конкурентного антагониста MCP-1 оказывает выраженный антипротеинурический эффект у больных активными протеинурическими формами ХГН, что подтверждает

эффективность блокады МСР-1 как перспективного метода таргетного воздействия на подоциты.

Степень достоверности и апробация результатов

Апробация работы состоялась 11 января 2018 года на заседании кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии медико-профилактического факультета Первого МГМУ имени И.М.Сеченова, кафедры внутренних болезней факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Материалы работы доложены на 48-м – 54-м Международных конгрессах Европейской Ассоциации Нефрологов-Европейской Диализной ассоциации (ERA-EDTA) (2011 – 2017гг.), Научной конференции «Декабрьские чтения» в клинике им. Е.М.Тареева (2013, 2014гг.), VIII съезде НОНР, Москва, 11-13 ноября 2015г., Научно-практической конференции ЦФО РФ Нефрологические и хирургические проблемы трансплантированной почки и диализа совместно с конференцией молодых ученых и специалистов «Молодая трансплантология и нефрология», 19-20 октября 2017г.

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в непосредственном участии в теоретическом обосновании (поиск и анализ литературы по теме диссертации) и практической реализации поставленных задач (набор пациентов, клиническое обследование, формирование базы данных, статистическая обработка, обобщение и анализ полученных результатов, обсуждение результатов в научных публикациях и их внедрение в практику). Автором освоены методики определения исследуемых фактором в моче, сыворотке крови и ткани почки (иммуноферментный анализ, цитофлуориметрический метод, иммуногистохимический метод исследования биоптатов). 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 и ревматологии УКБ №3 клиники нефрологии им. Е.М.Тареева, основные положения диссертации включены в материалы лекций и практических занятий для студентов, ординаторов и врачей по программам повышения квалификации кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии МПФ Первого МГМУ имени И.М.Сеченова (Сеченовский университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.29 – нефрология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 4, 5 и 6 паспорта нефрологии.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.04 – внутренние болезни. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2,3 и 4 паспорта внутренних болезней.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 40 печатных работ, в том числе, 13 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 211 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 361 источник, из которых 20 отечественных и 341 зарубежный. Диссертация иллюстрирована 54 рисунками, 15 таблицами, содержит 5 клинических наблюдений.

База проведения исследования

Исследование проведено в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева (Университетская клиническая больница №3) Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (директор – академик РАН, профессор Н.А. Мухин). Общеклинические и специальные исследования проведены в подразделениях Первого МГМУ имени И.М. Сеченова: в межклинической иммунологической лаборатории (зав. – А.Г.Серова), в межклинической биохимической лаборатории (зав. – Т.Н. Александровская), изучение биопсийного материала выполнено профессором В.А. Варшавским на кафедре патологической анатомии.

Глава 1.

Обзор литературы

Согласно современным представлениям в основе патогенеза хронического гломерулонефрита лежат процессы взаимодействия факторов повреждения и факторов, противодействующих повреждению и воспалению, которые объединяют в настоящее время в понятие «система самозащиты почки».

Центральным звеном гломерулярного поражения и ассоциированных с ним нарушений в системе самозащиты является повреждение подоцита - ключевого компонента фильтрационного барьера, ведущее к развитию протеинурии, которая по-прежнему рассматривается как клинический эквивалент активности/прогрессирования ХГН.

1.1 Подоцитарное повреждение. Маркеры подоцитарного повреждения при хроническом гломерулонефрите

Хронический гломерулонефрит – заболевание, при котором воспаление первоначально затрагивает клубочек и прогрессирует в результате ограниченных возможностей клубочков к регенерации. Эта особенность прежде всего связана с клетками гломерулярного фильтра – подоцитами [154,241]. К моменту рождения закладывается ограниченное количество подоцитов, что составляет примерно 800 клеток на клубочек в 2 миллионах нефронов. До настоящего времени не получено доказательств, свидетельствующих о способности подоцитов к делению. У взрослого человека в норме постоянно происходит потеря части подоцитов; однако при отсутствии болезни почек сохраняется стабильное число подоцитов, достаточное для поддержания фильтрационного барьера. Заболевания почек, в частности гломерулонефрит, существенно ускоряет процесс повреждения и потери подоцитов. Если число подоцитов в клубочке снижается более чем на 60% от нормы, клубочек вместе с нефроном будут потеряны [172].

1.1.2 Строение и функция фильтрационного барьера

Гломерулярный фильтрационный барьер состоит из базальной мембраны капилляров, монослоя эндотелиальных клеток, выстилающих гломерулярный фильтр изнутри, и монослоя подоцитов, которые выстилают гломерулярный фильтр снаружи, со стороны мочевого пространства [335]. Подоцитами и подоцит-ассоциированным молекулам придают в настоящее время наиболее важное значение в механизмах нарушения проницаемости гломерулярного фильтра и развития протеинурии [123]. Помимо обеспечения гломерулярной проницаемости подоциты выполняют ряд других важных функций: участвуют в поддержании структуры капиллярных петель за счет перестройки актинового цитоскелета, противодействуют внутрикапиллярному гидростатическому давлению, обеспечивают эндоцитоз фильтрующихся белков и иммуноглобулинов, которые могут повреждать гломерулярный фильтр, а также участвуют в процессах синтеза коллагена IV типа и репарации базальной мембраны, принимают участие в иммунном ответе, обеспечивают нормальную функцию других клеток клубочка - мезангиальных и эндотелиальных за счет продукции сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [39, 304].

В 2002г. Pollak объединил врожденные заболевания, протекающие с первичным повреждением подоцитов и нефротическим синдромом, термином «врожденные подоцитопатии» [248]. В настоящее время установлено, что изменение структуры и функции подоцита (подоцитопатия), ранее считавшееся специфическим признаком болезни минимальных изменений, встречается и при других формах ХГН, при диабетической и гипертонической нефропатиях [153].

1.1.3 Ответ подоцитов на повреждение. Подоцитурия

Повреждение подоцитов, которое в соответствии с расположением этих клеток снаружи капиллярной стенки ведет к нарушению гломерулярной базальной мембраны, лежит в основе протеинурии и нефротического синдрома [71, 73, 158]. Наиболее ранним признаком повреждения подоцита, которые можно

определить только при электронной микроскопии, является распластывание ножек подоцитов. Этот процесс осуществляется за счет перестройки актинового цитоскелета, перераспределения актиновых микрофиламентов, в результате которого отростки подоцитов теряют свою форму. В результате распластывания ножек/отростков подоцитов щелевая диафрагма растягивается, межподоцитарное пространство увеличивается, возникает протеинурия. Процесс распластывания ножек подоцитов в настоящее время рассматривается скорее, как адаптивный, позволяющий сохранить целостность клетки и препятствующий более серьезному повреждению – «оголению» гломерулярной базальной мембраны [129,155,239]. Подоциты отвечают на повреждение особым способом. В первую очередь после повреждающего воздействия на клубочек может развиваться гипертрофия подоцитов, при этом тело подоцита и субподоцитарное пространство расширяются, таким образом клетка закрывает обширные области сосудистого гломерулярного пучка [220,224]. В отличие от других типов клеток, подоциты могут поддерживать жизнеспособность, несмотря на выраженное изменение формы. Другим процессом, который развивается в ответ на повреждение, является потеря или распластывание ножковых отростков подоцитов (ножек подоцитов). Значение этого процесса до сих пор широко дискутируется. Подоциты в состоянии распластывания формируют длинные апикальные микроворсинки - “микроворсинчатая трансформация”. Микроворсинки обладают способностью прикрепляться к гломерулярной базальной мембране или париетальной базальной мембране. Функционально, это явление необходимо для перемещения/миграции подоцитов в другие области клубочка [58,167].

Распластывание ножек подоцитов происходит в два этапа. На первом этапе отростки подоцитов теряют форму [101]. Происходит потеря щелевой диафрагмы или ее апикальное перемещение. Так как в культуре клеток после прекращения воздействия повреждающего фактора происходит быстрое восстановление формы подоцитов, этот этап является потенциально обратимым [256].

На втором этапе клетки теряют свою обычную форму, вместо этого клетка плотно прилежит непосредственно к ГБМ, субподоцитарное пространство исчезает. Во время заключительного этапа происходит тесное прилегание подоцита к ГБМ [278], что показано в эксперименте на животных моделях и при ХГН у человека, включая болезнь минимальных изменений, мембранозную нефропатию и IgA-нефропатию [280]. Значение этого этапа заключается в полной потере ножковых отростков подоцитов и их слиянии с телом клетки, что приводит к широкому распластыванию подоцита в виде диска, который покрывает большую площадь оголенной базальной мембраны, препятствуя проникновению белка через гломерулярный фильтр.

Однако процесс распластывания не может в полной мере предотвратить проникновение белка через гломерулярный фильтрационный барьер, так как оголенные участки неизбежно возникают, с другой стороны, меняются структура и функции щелевой диафрагмы, что приводит к появлению протеинурии. Кроме того, распластывание ножек подоцитов в большинстве случаев предшествует отслойке клетки от базальной мембраны. Оголение ГБМ приводит к образованию «грыжевидных» выпячиваний вследствие высокого внутригломерулярного давления и адгезиям гломерулярных петель к капсуле Боумена [85], что индуцирует процессы гломерулосклероза.

Следует отметить, что отслоившиеся таким образом подоциты «жизнеспособны» и могут образовывать контакты с другими клетками в культуре [320]. Нага и соавт. определил подоциты и их фрагменты в моче больных с различными гломерулярными заболеваниями, используя антитела к подоцитарным белкам: подокаликсину, подоцину, нефрину, синаптоподину [110,111,112]. Выраженность экскреции подоцитов с мочой нарастала параллельно протеинурии и отражала активность гломерулонефрита, в то время как у здоровых лиц и пациентов с ремиссией ХГН подоциты в моче определяются в небольшом количестве. При многих первичных гломерулопатиях, включая фокальный сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), мембранозную нефропатию,

мезангиокапиллярный гломерулонефрит наблюдается повреждение подоцитов и появление подоцитурии [269]. Такая же закономерность была выявлена и для волчаночного нефрита [191,222].

Кроме того, Нара и соавт. показали, что подоциты отделяются от ГБМ и слущиваются в мочу при активном течении IgA нефропатии, и степень подоцитурии отражает активность этого заболевания [113]. При этом повреждение подоцитов вторично и осуществляется в результате повышения активности РААС и внутригломерулярного давления. В случае IgA нефропатии в появлении подоцитурии обсуждают также роль активации комплемента в повреждении подоцитов в результате депозиции мембраноатакующего комплекса C5b-9 субэпителиально [341]. Обсуждается также роль механического воздействия на подоциты в условиях изменения архитектоники клубочка при первичном повреждении мезангиальных клеток. Так, при Thy-1 –нефрите изменение формы капиллярных петель за счет повреждения мезангиальных клеток (мезангиолизиса) приводит к протрузии капиллярных петель в мочевое пространство. Подоциты в этом случае подвергаются shear stress (напряжению сдвига), вытягиваются, в этой области отмечается наиболее высокая скорость движения ультрафильтрата, таким образом, подоциты в этих участках более подвержены слущиванию. Процесс распластывания ножек подоцитов является реакцией на механическое растяжение и предшествует отслоению подоцитов от ГБМ и слущиванию [155].

Исследованиями последних лет показано, что протеинурия не всегда точно отражает процессы, происходящие в клубочке при повреждении, в то время как подоцитурия является, по-видимому, более точным маркером этого процесса. Таким образом, исследование процесса повреждения и потери подоцитов является перспективным направлением дальнейших исследований.

Так, в двух экспериментальных моделях гломерулярного повреждения: как при первичном (PAN-нефрозе), так и вторичном ГН (анти-Thy1.1-нефрите) на ранней стадии нефрита отмечалось появление подоцитурии и протеинурии. Однако в

более поздней стадии экспериментального нефрита отмечалось исчезновение подоцитурии (активного повреждения), в то время как протеинурия персистировала. Авторы полагают, что подоцитурия является более специфичным показателем активного гломерулярного повреждения, а показатель протеинурии не позволяет провести различия между хроническим дефектом гломерулярного барьера и активным повреждением клубочков почек. Следует отметить, что в модели мезангиопролиферативного нефрита - анти-Thy1.1-нефрита первичное повреждение затрагивает мезагиальные клетки клубочка, однако вторично возникает также повреждение подоцитов с развитием протеинурии [211,351].

1.1.4 Нефринурия

При воздействии гемодинамических или провоспалительных факторов подоциты подвергаются структурно-функциональным изменениям с отслоением их от ГБМ и появлением в моче – процесс обозначаемый как подоцитурия, с другой стороны, в моче обнаруживаются и специфические подоцитарные белки, в первую очередь основного белка щелевой диафрагмы нефрина, которые следует рассматривать как маркеры подоцитарного повреждения.

Так как щелевая диафрагма является своеобразной «платформой» передачи сигналов, необходимых для поддержания функций подоцитов, появление ее структурного компонента нефрина также является стереотипной реакцией подоцита на повреждение при активных формах ХГН [48, 123,153, 305].

С одной стороны, нефрин формирует связи с актиновыми волокнами цитокелета подоцитарной клетки, с другой стороны, молекулы нефрина образуют межподоцитарную щелевую диафрагму, взаимодействуя между собой [266].

Благодаря экспериментальным исследованиям последних лет было показано, что при приобретенных формах нефротического синдрома отмечается повышение экскреции нефрина с мочой вследствие повреждения подоцитов и тесно связанной с ними щелевой диафрагмы [83]. В исследовании Luimula и соавт. в модели PAN нефроза у крыс показано повышение экскреции нефрина с

мочой на пике протеинурии [186]. В экспериментальной модели мембранозной нефропатии (Хеймановский нефрит) внедрение в мембрану подоцитов компонентов комплемента (C5b-9) приводит к повреждению F-актина и отщеплению молекулы нефрина от подоцита с последующей экскрецией с мочой [223]. При этом в ткани почки при электронной иммуномикроскопии еще до развития протеинурии обнаруживаются участки разрушения щелевой диафрагмы, что соответствует областям сниженной экспрессии нефрина. При далеко зашедшем процессе в случае развития высокой протеинурии количество этих участков значительно увеличивается, причем они характеризуются неравномерным распределением и чередуются с абсолютно сохранными областями щелевой диафрагмы [124]. В этих исследованиях впервые была продемонстрирована роль нефринурии в появлении очаговых дефектов щелевой диафрагмы, как важного механизма развития протеинурии (ПУ) [351]. У больных ХГН получены данные об уменьшении экспрессии нефрина в ткани почки независимо от морфологической формы - при минимальных изменениях, ФСГС, мембранозной нефропатии, МКГН, МПГН, диабетической нефропатии, а также при волчаночном нефрите [20,83,98,240]. В работе Оранского С.П. и соавт. также показано, что при НС у больных с РА уровень нефринурии был достоверно выше, чем контрольной группе, и что особенно интересно, что у больных с ХГН выше, чем у пациентов с амилоидозом [13]. В исследовании Aaltonen и соавт. в экспериментальной модели диабетической нефропатии у крыс пик нефринурии определялся еще до появления альбуминурии, это позволило сделать заключение, что нефринурия может являться ранним биомаркером гломерулярного повреждения [21].

1.1.5 Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) при ХГН

VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста) – ангиогенный фактор, который является ключевым в регуляции всех трех компонентов гломерулярного фильтрационного барьера [88]. В эксперименте показано, что при введении анти-VEGF антител или растворимого VEGF рецептора (sFlt-1) у мышей развивается

протеинурия [293]. У онкологических больных, которым проводится анти-VEGF (бевацизумаб – овастин) терапия, отмечается появление протеинурии, подоцитурии, артериальной гипертензии и гломерулярной тромботической микроангиопатии, приводящих к повреждению гломерулярного барьера [89, 131,238,344]. У женщин с преэклампсией, характеризующейся циркуляцией sFlt-1 плацентарного происхождения, развиваются симптомы похожие на возникающие при лечении анти-VEGF препаратами [200,217]. Эти данные подтверждают важную роль VEGF в регуляции гломерулярного барьера и механизмах развития протеинурии.

В почке человека наиболее распространенной формой является VEGF-A, который экспрессируется преимущественно подоцитами и частично - тубулярными клетками [281]. Рецепторы к VEGF-A (1 и 2 типа) экспрессируются гломерулярным эндотелием и эндотелиальными клетками пре- и постгломерулярных сосудов [282]. Экспрессия VEGFR-1 была выявлена во многих типах клеток, VEGFR-2 – обнаружена главным образом в подоцитах [118].

При различных формах гломерулонефрита в эксперименте и у человека получены противоречивые результаты. В некоторых экспериментальных моделях ХГН количество VEGF и VEGFR было повышено и коррелировало с уровнем протеинурии [120]. У больных ХГН с минимальными изменениями уровень VEGF в моче также был выше и зависел от выраженности НС [199], причем увеличение экспрессии VEGF было выявлено в первую очередь в подоцитах [38]. Hohenstein и соавт. установили повышение экспрессии VEGF в биоптатах почек пациентов с эндокапиллярным нефритом, МКГН и нефритом с полулуниями. В биоптатах почек пациентов с мембранозной нефропатией VEGF экспрессировался также преимущественно в подоцитах [118]. Напротив, в других экспериментальных или клинических исследованиях было показано уменьшение или отсутствие экспрессии VEGF-VEGFR [38,159,274]. Показано, что экспрессия VEGF в почечной ткани происходит в большей степени при острых процессах: остром гломерулонефрите и посттрансплантационной нефропатии, в то время как при

хронических процессах экспрессия снижается (19). Снижение экспрессии было отмечено при многих формах гломерулопатий, в том числе при ФСГС, диабетической нефропатии, нефрите с полулуниями и волчаночном нефрите [280].

Egemin и соавт. на модели мышей с полным отсутствием VEGF в подоцитах [90] показали, что эти животные погибают от почечной недостаточности в течение 18 часов после рождения. В клубочках этих мышей не формируется фильтрационный барьер вследствие дефекта выживаемости и дифференциации эндотелиальных клеток. У мышей с гетерозиготным носительством мутации VEGF отмечались развитие протеинурии, эндотелиоза и аваскулярные клубочки. С другой стороны, повышение экспрессии VEGFA в подоцитах ведет к развитию коллабирующей нефропатии и почечной недостаточности [90].

Подоциты как фетальные, так и зрелые, дифференцированные являются основным источником VEGF-A, [22]. Рецепторы (VEGFR-1 and VEGFR-2) экспрессируются на гломерулярных эндотелиальных клетках, что свидетельствует о паракринной регуляции функции клеток фильтрационного барьера подоцитами. В то же время небольшой уровень экспрессии VEGFR-2 на самих подоцитах также говорит о наличии аутокринной регуляции подоцитов в норме и при повреждении.

Результаты этих исследований свидетельствуют о необходимости тонкой регуляции VEGF сигнала, который необходим для поддержания гломерулярного фильтрационного барьера, в том числе для нормального фосфорилирования белка щелевой диафрагмы нефрина. Нарушение фосфорилирования нефрина при дефиците VEGF ослабляет связывание нефрина с подоцином, приводит к отщеплению экстрацеллюлярной части молекулы нефрина от мембраны подоцита и повышению экскреции этого белка с мочой. Повреждение эндотелия и подоцитов со снижением экспрессии белков щелевой диафрагмы и возникновением ПУ при дефиците VEGF было впервые показано у женщин с

преэклампсией [100]. В эксперименте было показано, что создание дефицита VEGF при анти-БМК-нефрите приводит к более тяжелому течению с нарушением функции белков щелевой диафрагмы, потере ножек подоцитов и протеинурии [109].

При исследовании у пациентов с ССД наряду с повышением VEGF отмечено нарастание IL-6 и MCP-1 в сыворотке и в моче по сравнению контролем. Повышение VEGF в моче может свидетельствовать о поражении тубулоинтерстициальной ткани [15].

Учитывая важную роль повреждения подоцитов в прогрессировании гломерулосклероза, в последние годы значительно возрос интерес к «мочевым» биомаркерам, количественное определение которых позволяет мониторировать выраженность структурно-функциональных нарушений подоцитов. Для определения выраженности повреждения гломерулярного фильтра у больных с различными формами гломерулонефрита в настоящее время применяются различные методы - создание культуры клеток для определения в моче «жизнеспособных» подоцитов и подоцитов в состоянии апоптоза, выявление различных структурных белков подоцитов и щелевой диафрагмы, в том числе нефрина, подоцина, подопланина, синаптоподина, подокаликсина, цитофлоуметрия мочевого осадка с использованием антител к подокаликсину, а также иммуноблоттинг мочи для выявления мРНК этих белков [237,305]. Однако имеются немногочисленные клинические работы этого направления, большинство из которых выполнены у больных сахарным диабетом, и отдельные исследования у больных ХГН [237,305].

1.2 Механизмы подоцитопении – основной детерминанты гломерулосклероза

Слущивание и потеря подоцитов является центральным механизмом развития гломерулосклероза при гломерулонефрите [143]. Прогрессирующие формы ХГН и в эксперименте, и в клинических условиях сопровождаются подоцитопенией [156].

В условиях нормального развития ткани почки закладывается большое количество нефронов, которое превышает достаточное для функционирования почки количество. Это способствует адаптации почки к повышающимся потребностям в условиях растущего организма и у взрослого человека.[188,261]. После 60 лет количество нефронов сокращается на 50%, и в этом случае исходная олигонефрония является одной из ведущих причин формирования почечной недостаточности при заболеваниях почек. Но даже в условиях нормального (достаточного) количества нефронов важное значение в развитии почечной недостаточности имеет потеря подоцитов при первичных и вторичных гломерулопатиях.

В настоящее время получены свидетельства того, что в ткани почки взрослого человека существуют стволовые клетки-предшественники подоцитов, которые локализуются на мочевом полюсе клубочка в области соединения гломерулярного и канальцевого эпителия и вдоль Боуменовой капсулы. Эти клетки способны дифференцироваться в зрелые подоциты [30]. Клетки-предшественники могут мигрировать на ГБМ, что было показано в некоторых экспериментальных моделях ХГН. Также было установлено, что париетальные эпителиальные клетки капсулы Боумена экспрессируют маркеры стволовой клетки CD24 и CD133. По мере приближения к сосудистому полюсу клубочка они постепенно теряют эти маркеры, приобретают подоцитарные маркеры и дифференцируются в зрелые подоциты. Предположительно, другим источником обновления подоцитов в клубочке могут являться стволовые клетки костного мозга [30]. Однако работ, подтверждающих это предположение в клинических условиях у человека, нет. Отсутствуют также данные и о том, что в клубочке человека существуют условия для запрограммированной миграции клеток – предшественников в «оголенные» области ГБМ в норме или в патологических условиях при потере подоцитов. Наконец, постоянный поток фильтрата в Боуменовом пространстве также должен препятствовать прикреплению и делению этих клеток [261].

В настоящее время существует несколько гипотез, объясняющих формирование подоцитопении при иммуно-опосредованных заболеваниях. Процесс повреждения подоцитов приводит к нарушению синтеза подоцитарных адгезивных белков, отделению этих клеток от гломерулярной базальной мембраны и, в конечном счете, к слущиванию их в мочевое пространство - подоцитурии. Подоциты как высокодифференцированные клетки не способны к пролиферации и замещению, поэтому прогрессирующая потеря этих клеток в клубочке почки влечет за собой оголение ГБМ и запускает процессы гломерулосклероза [157,158,242].

Другим не менее важным механизмом потери подоцитов является процесс апоптоза, который также является причиной отслоения подоцитов от ГБМ и экскреции в мочевое пространство [143,271]. Обсуждаются также процессы гипертрофии подоцита и эпителиально-мезенхимальной трансдифференциации, которые уменьшают адгезивные свойства клетки и способствуют слущиванию «живых» подоцитов [207,255,343]. Так, исследования в культуре клеток показали, что реакцией подоцита на механическое растяжение является гипертрофия, в частности, за счет активации ингибиторов клеточного цикла [244]. В этом случае достаточно часто наблюдается деление ядра, в то время как полного деления клетки не происходит, доказательством чему служит появление двухядерных и многоядерных подоцитов [243]. Параллельно процессу гипертрофии подоцитов наблюдается снижение адгезии их к ГБМ, отделение от ГБМ и слущивание в мочу [69].

В этих условиях, по-видимому, интенсивная отслойка подоцитов от БМК и потеря их с мочой приводят к развитию подоцитопении, что сопровождается «оголением» отдельных участков БМК, потерей формы капиллярных петель с образованием локальных выпячиваний базальной мембраны. При контакте этих «выбуханий» с париетальными клетками клубочка формируются синехии между капиллярными петлями и Боуеновой капсулой клубочка, что является пусковым механизмом для начала склерозирования клубочков [172]. Так как подоциты

являются высокодифференцированными клетками с ограниченным пролиферативным потенциалом, уменьшение числа подоцитов приводит к необратимому дефекту гломерулярного фильтра, способствует формированию синехий между капиллярными петлями и Боуеновой капсулой клубочка и является пусковым механизмом для начала склерозирования клубочков. В связи с этим критическое снижение количества подоцитов (подоцитопения) в клубочках является основным фактором прогрессирования гломерулосклероза и снижения скорости клубочковой фильтрации [156,172].

Следовательно, высокая подоцитурия, особенно у больных с длительно персистирующим НС, указывая на повреждение подоцитов, тяжелый дефект гломерулярного барьера, является неблагоприятным признаком. Поэтому для оценки течения и прогноза ХГН выявление подоцитопатии по мочевым тестам очень важно с клинических позиций.

1.3 Факторы повреждения клубочков почек при ХГН

1.3.1. Моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1)

Моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), также известный как моноцитарный хемотаксический и активирующий фактор (MCAF) относится к группе СС-хемокинов. Был первоначально обнаружен в периферической крови и охарактеризован как фактор, обладающий хемотаксическими свойствами в отношении моноцитов, но позже показано его взаимодействие с Т-лимфоцитами и НК клетками. [325]. У больных гломерулонефритом 56.9% клеток, экспрессирующих MCP-1, являются моноцитами/макрофагами [66]. То есть в ткани почки MCP-1 участвует в формировании воспалительного лимфо-макрофагального (мононуклеарного) инфильтрата [37].

В опытах *in vitro* и в экспериментальных моделях было показано, что все резидентные клетки в почке экспрессируют хемокины, в том числе MCP-1, и их рецепторы [37]. Помимо мезангиальных, эндотелиальных, мононуклеарных клеток инфильтрата и тубулярных клеток, подоциты экспрессируют MCP-1 [37,

323]. Повышение выработки MCP-1 происходит в ответ на компоненты протеинурии [330], а также в ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами [103,250], в том числе ИЛ-1 β и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α). Согласно данным, полученным на животных моделях нефрита, а также при различных заболеваниях почек у человека, CCL2/MCP-1 играет важную роль в прогрессировании гломерулонефрита и формировании почечной недостаточности [324].

Хемокины активируют клетки после связывания со специфическими рецепторами на поверхности лейкоцитов, тубулярных клеток и гладкомышечных клеток сосудов. Стимуляция этих рецепторов является триггером для цепи внутриклеточных реакций, ведущих к образованию инозитол-трифосфата, высвобождению кальция и каскаду внутриклеточных митогенактивированных протеинкиназ (МАРК) с активацией NF κ B [317].

На культуре клеток было доказано, что MCP-1 не только обеспечивает привлечение лимфоцитов и моноцитов из сосудистого русла в очаг воспаления, но также является провоспалительным фактором, который активирует резидентные клетки почки – подоциты и тубулярные клетки с их последующей трансдифференциацией в миофибробласты, мезангиальные клетки, резидентные фибробласты с активацией синтеза коллагена [51]. Помимо этого, при воздействии на тубулярные клетки *in vitro* [317], вызывает повышение секреции этими клетками провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6 и TGF β .

Повышение экскреции MCP-1 с мочой происходит в дебюте и при обострениях почечного процесса. Увеличение количества MCP-1 в моче выявлено у животных с прогрессирующей нефропатией, уровень MCP-1 в моче коррелировал с экскрецией белка почечного происхождения [289]. Количество MCP-1 в моче больных с волчаночным нефритом коррелирует с клиническими и морфологическими признаками активности нефрита: числом полулуний, степенью интерстициальной инфильтрации макрофагами, тубулярной атрофией, степенью ремоделирования тубуло-интерстиция [325]. Экскреция MCP-1 с мочой

увеличивается при гломерулонефрите у человека, коррелируя с активностью заболевания [17,322].

МСР-1 играет роль в прогрессировании гломерулярных изменений [235,294]. В экспериментальной модели транзиторного иммунокомплексного нефрита мышей на ранних этапах происходит синтез МСР-1 и его рецепторов клетками клубочка, что проявляется нарастанием протеинурии. Однако уже на пике протеинурии и максимальной лейкоцитарной инфильтрации почечной ткани экспрессия этого хемокина и его рецепторов клетками клубочка начинает уменьшаться и возвращается к исходным значениям в случае выздоровления - резолюции нефрита [7]. При быстро прогрессирующем нефрите у человека МСР-1 экспрессируется клетками полулуний и париетальным эпителием, а также тубулярными клетками и лимфоцитами, инфильтрирующими интерстиций [276]. Введение нейтрализующих антител к МСР-1 в эксперименте приводило к уменьшению выраженности мочевого синдрома, проявлявшегося протеинурией, а морфологически отмечалось снижение степени инфильтрации клубочков макрофагами и накопление склероза [321].

Нейтрализация МСР-1 у мышей с нефритом с помощью моноклональных антител сопровождалось значительным уменьшением количества полулуний в гломерулах и отложения в интерстиции компонентов экстрацеллюлярного матрикса, в том числе коллагена [183].

По современным представлениям традиционно применяемые в нефрологии преднизолон и ингибиторы кальцийнейрина а также ингибиторы АПФ и блокаторы рецепторов к ангиотензину оказывают антихемокиновое действие, в частности, через влияние на ядерный фактор NF-kB [236].

МСР-1 является профиброгенным хемокином, так как участвует в активации синтеза клетками лимфоцитарно-макрофагального инфильтрата профиброгенных цитокинов, в частности трансформирующего фактора роста β (TGF- β) [104,272].

1.3.2 Интерлейкин-6

Интерлейкин-6 – полипептид с молекулярной массой 22-27 кДа, который секретируется активированными моноцитами, макрофагами, фибробластами в ответ на провоспалительные стимулы, такие как ФНО- α , ИЛ-1 β , оксидантный стресс [258]. Резидентные клетки почки – подоциты, эндотелиальные клетки, мезангиальные и тубулярные клетки могут секретировать ИЛ-6. Подоциты – единственные клетки почечной ткани, которые экспрессируют рецепторы к ИЛ-6 [68,225]. При добавлении к культуре подоцитов провоспалительных медиаторов (ЛПС, ФНО-альфа, ИЛ-1 бета) отмечено нарастание концентрации ИЛ-6 [171,286]. Подоциты являются клетками, которые могут экспрессировать рецепторы к ИЛ-6, их количество также зависит от провоспалительных стимулов [214]. Anderson M и соавт. определили, что под действием ангиотензина II в течение 6–24 часов, отмечается фосфорилирование STAT3, который является одним из белков-посредников, обеспечивающих ответ клетки на сигналы, поступающие через рецепторы интерлейкинов и факторов роста, в подоцитах, что влияет на дифференциацию, клеточный цикл и другие патофизиологические процессы в этих клетках [28,31]. Этот эффект блокируется ингибиторами кальцийнейрина. Во многих экспериментальных моделях делеция гена STAT3 в подоцитах приводит к отсутствию гломерулярного и интерстициального повреждения [73,92,185].

ИЛ-6 вызывает также пролиферацию мезангиальных клеток и накопление мезангиального матрикса [106,184]. Взаимодействие ИЛ-6 с эндотелиальными клетками стимулирует образование воспалительного инфильтрата - привлечение лейкоцитов и секрецию хемокинов. У мышей с отсутствием ИЛ-6 отмечается уменьшение количества лейкоцитов в области воспаления, а также снижение экспрессии адгезивных молекул и продукции хемокинов [262]. В тубулярных клетках ИЛ-6 активирует продукцию коллагена I типа и запускает интерстициальный фиброз, что ассоциировано прежде всего с активацией STAT3 [252].

В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что ИЛ-6 способствует прогрессированию хронического гломерулонефрита. Повышение экспрессии ИЛ-6 в ткани почки и повышение экскреции с мочой было выявлено при мезангиопролиферативном гломерулонефрите, что сопровождается высокой активностью и ухудшением прогноза [119]. В модели волчаночного нефрита повышение экскреции ИЛ-6 с мочой отражает степень повреждения ткани почки и прогрессирование, а у трансгенных мышей с повышенной экспрессией ИЛ-6 развивается протеинурия и почечная недостаточность [91,140,179].

1.3.3 Матриксные металлопротеиназы (ММП)

Баланс между синтезом и деградацией компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) является основой структурной и функциональной целостности клубочка. Изменения экспрессии или активности ММП непосредственно участвуют в интенсивности обмена ЭЦМ и могут способствовать гломерулосклерозу и снижению функции почек.

Матриксные металлопротеиназы – многочисленное семейство цинк-содержащих и цинк –зависимых эндопептидаз, в настоящее время известно около 28 различных ММП. Матриксные металлопротеиназы расщепляют компоненты экстрацеллюлярного матрикса, главным образом коллаген IV типа – компонент базальных мембран. Помимо компонентов экстрацеллюлярного матрикса ММП регулируют активность других, нематриксных субстратов, например ФНО- α , факторов роста, ангиотензина-II, TGF- β , плазминогена, эндотелина и т.д. и играют центральную роль в процессах индукции и прогрессировании воспаления, а также восстановлении почечной ткани [82,99,264,318].

ММП-2 (или желатиназа А) имеет молекулярный вес 72 кДа, расщепляет коллаген IV типа, фибронектин, ламинин, желатин, эластин и нематриксные субстраты - TGF- β , MCP, эндотелин, плазминоген. ММП-9 (или желатиназа В) имеет вес 92 кДа, расщепляет главным образом коллаген IV типа, а также трансферрин, ангиотензин I и II, плазминоген, про- TGF- β , ИЛ-1 α . ММП-2

относится к конституциональным ферментам, в то время как ММП-9 активируется плазмином/плазминогеном и регулируется цитокинами и факторами роста [79].

Активность металлопротеиназ контролируется эндогенными тканевыми ингибиторами (ТИМП). ТИМП (21-28 кДа) – специфические эндогенные ингибиторы, связывающие ММП. Среди них 4 члена семейства (ТИМП-1,-2,-3,4) идентифицированы у человека. ММП-2 и ММП-9 формируют проэнзимные комплексы с эндогенными ингибиторами – ТИМП-2 и ТИМП-1 соответственно. Увеличение индекса ТИМП /ММП свидетельствует о более полном контроле протеолитической активности металлопротеиназ [45].

ММП придают важное значение в процессах развития воспаления, формирования протеинурии, гломерулосклероза и тубуло-интерстициального фиброза. В модели мышей с дефицитом $\alpha 3$ цепи коллагена IV типа отмечалось увеличение экспрессии ММП-2 и ММП-9 в клубочках за месяц до появления протеинурии. В более поздней фазе заболевания на этапе формирования интерстициального фиброза было установлено перераспределение экспрессии металлопротеиназ с переходом на тубуло-интерстиций. В этой модели ингибция ММП-2 и -9 с помощью фармакологических агентов перед появлением протеинурии приводило к торможению прогрессирования заболевания и увеличению выживаемости. Напротив, подавление экспрессии ММП после развития протеинурии приводило к ускоренному интерстициальному фиброзу. Таким образом, на ранних стадиях болезни почек экспрессия ММП способствует прогрессированию заболевания, в то время как на более поздних этапах ММП необходимы для расщепления компонентов ЭЦМ и могут препятствовать ускоренному фиброзу почечной ткани [263,264,357].

Повышение экспрессии ММП-2, -9 в почке было показано у мышей с волчаночным нефритом, анти-Thy-1.1-нефритом и у крыс с Хеймановским нефритом [201,221,287]. Подавление активности металлопротеиназ в эксперименте у животных уменьшает отложения коллагена в ткани почки,

количество миофибробластов и степень гломерулосклероза [205,287]. В модели ФСГС у мышей с отсутствием гена *Mpv17* и персистирующим высоким уровнем ММП-2 отмечено развитие тяжелой протеинурии и ускоренного гломерулосклероза [257].

Повышенные уровни ММП и ТИМП были также установлены при различных формах гломерулонефрита у человека, включая быстропрогрессирующие формы (в рамках АНСА васкулита), IgA нефропатию, острый постинфекционный гломерулонефрит [24,128,149,309]. В модели мембранозной нефропатии было показано повышение экспрессии ММП-9 в клубочках почек, преимущественно в подоцитах [201]. Экспериментальные данные и результаты, полученные у человека, предполагают, что повышенный уровень экспрессии ММП способствует прогрессированию заболевания, а повышенная активность ММП – структурным повреждениям в ткани почки при ХГН.

Немаловажную роль играет участие ММП в привлечении клеток в очаг воспаления [176]. ММП при расщеплении молекул субстрата могут играть роль в экспозиции иммунореактивных эпитопов. ММП-9 поддерживает воспаление путем расщепления коллагена на фрагменты, которые обладают хемотаксическими свойствами для нейтрофилов и стимулируют их к высвобождению еще большего количества ММП-9 [342]. Более того, ММП-9 стимулирует миграционные свойства дендритных клеток и могут связываться с ко-стимуляторными молекулами на поверхности клеток [122,346]. Ингибция желатиназ тормозит пролиферацию лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* [47].

ММП являются частью процесса эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) клеток ткани почки – подоцитов и тубулярных клеток. В процессе ЭМТ происходит дедифференциация подоцитов и приобретение ими маркеров мезанхимальных клеток, в том числе экспрессия ММП-9 [177]. ММП-2 и ММП-9 локализуются в зонах ЭМТ тубулярного эпителия, индуцируют появление миофибробластов [63,298]. Повышение экспрессии ММП-2 в

проксимальном тубулярном эпителии стимулирует разрушение ГБМ и тубулярную атрофию, а также миграцию клеток, подвергшихся трансформации в миофибробласты, в интерстициальную ткань почки [64].

Синтез, накопление матрикса и утолщение ГБМ происходит под влиянием провоспалительных факторов, в том числе TGF- β , ФНО, ИЛ-1, в то время как деградация осуществляется системой ММП/ТИМП. [139]. ММП-2 в очагах воспаления продуцируется фибробластами, подоцитами и мезангиальными клетками (МК), ММП-9 – подоцитами и МК. Экспрессируются ММП в клубочках (преимущественно в эпителиальных и мезангиальных клетках) и канальцах (главным образом проксимальных) [44]. При воспалительных заболеваниях почек повышение уровня ММП в целом отражает активность заболевания и накопление воспалительных клеток. И уровень, и длительность повышения ММП отражает тяжесть повреждения и воспаления [44,57, 39,173]. Однако эффект действия различных матриксных металлопротеиназ неоднозначен. Например, в исследовании Bauvois В и соавт. показано, что раннее повышение экспрессии и активности ММП-2 и напротив, снижение активности ММП-9 являются предиктором развития интерстициального фиброза и гломерулосклероза [44].

1.4 «Система самозащиты почки»

Факторы, определяющие дальнейшее прогрессирование ХГН или восстановление почечной функции в результате воспаления, являются важными для изучения патофизиологических механизмов развития заболеваний почек и разработки эффективных средств воздействия. Повреждающие (эффektorные) факторы (клетки воспалительного инфильтрата и высвобождаемые ими воспалительные цитокины, метаболиты арахидоновой кислоты и кислородные радикалы, тромбоциты, активация комплемента) являются наиболее изученным звеном в процессах прогрессирования заболеваний почек. Однако степень повреждения ткани почки и дальнейшее течение заболевания зависит от взаимодействия факторов воспаления/повреждения и состояния механизмов

«самозащиты ткани почки». Повышение локальной самозащиты различных тканей в ответ на повреждающие факторы внешней среды представляет собой универсальную запрограммированную реакцию. Хорошо известными примерами являются «предсостояние ишемии», когда создание ишемии тканей на короткий период защищает их от последующей тяжелой ишемии, и термотолерантность, связанные с экспрессией особых белков теплового шока и развитием резистентности тканей к повреждению. Клетки почечной ткани не являются исключением и, находясь в воспалительном микроокружении, могут становиться нечувствительными (резистентными) к стимулам воспаления и демонстрировать потенциал самозащиты ткани почки от дальнейшего повреждения - «противовоспалительный» статус.

Впервые гипотеза о существовании системы самозащиты почечной ткани была сформулирована на основании данных, полученных *in vitro*. Было показано, что при добавлении провоспалительного цитокина ИЛ-1 β к культуре резидентных клеток нормальных клубочков усиливается выработка ими воспалительных молекул, тогда как в клетках нефритических клубочков (с воспалением) ответ на провоспалительные стимулы оказался гораздо слабее [115,145]. Было обращено внимание и на то, что при анти-Thy-1нефрите – модели самостоятельного восстановления почечной ткани, в течение регенераторной фазы, несмотря на стимуляцию провоспалительными молекулами, дальнейшей активации клеток клубочка не происходит [137]. Таким образом, были получены доказательства толерантности клеток почечной ткани к воспалительным стимулам. Активация эндогенных факторов «самозащиты» на различных уровнях – вне- и внутриклеточном, а также на поверхности клеток лежит в основе формирования «противовоспалительного статуса» ткани почки. Так, активированные в процессе воспаления резидентные клетки способны секретировать во внеклеточное пространство инактиваторы лейкоцитов и тромбоцитов или ингибиторы специфических медиаторов, включая цитокины и факторы роста, оксиданты, протеиназы и др. Внутриклеточные защитные белки теплового шока, экспрессия

которых повышается в ответ на неблагоприятные внешние воздействия и изменения в микроокружении клетки, обеспечивают резистентность клеток ткани почки к различным видам повреждения, в том числе и к факторам воспаления.

Система самозащиты почки состоит из «конституциональных», постоянно экспрессирующихся молекул, которые участвуют в поддержании целостности почечной ткани и предотвращении ее повреждения, например, отдельные белки теплового шока, регуляторные белки комплемента, и гепарин/гепарансульфатпротеогликаны. Однако главным участником протективной системы являются «индуцируемые» молекулы, локальный синтез которых многократно усиливается под действием воспалительного микроокружения. Только «индуцированная» защита может эффективно блокировать патологический воспалительный ответ и обеспечивать обратное развитие (разрешение) воспаления.

1.4.1 Внеклеточная защита: ингибиторы воспалительных медиаторов

В процессе воспаления источником воспалительных факторов и медиаторов являются как клетки лимфо-гистиоцитарного инфильтрата, так и резидентные клетки почечной ткани, приобретающие провоспалительный фенотип. Вследствие этого процесс воспаления подвергается многократному усилению. Однако благодаря существованию системы контроля – «механизмов самозащиты» ткани почки воспаление во многих случаях подвергается обратному развитию и самостоятельно подавляется. Одним из таких механизмов является выделение специфических ингибиторов провоспалительных медиаторов, которые секретируются клетками воспалительного инфильтрата параллельно выделению эффекторов/повреждающих факторов воспаления. Эта система медиатор воспаления/ингибитор, существующая у млекопитающих, играет важную роль в предотвращении и резолуции воспаления.

1.4.1.1 Антагонист рецептора интерлейкина-1 (ИЛ-1ра)

Интерлейкин-1 –провоспалительный цитокин, имеющий первостепенное значение в патогенезе многих воспалительных заболеваний. Продукция ИЛ-1 была продемонстрирована при экспериментальном нефрите и гломерулонефрите у человека. ИЛ-1 продуцируется клетками воспалительного инфильтрата, вызывает высвобождение других воспалительных медиаторов, в том числе цитокинов/факторов роста, хемокинов, биоактивных липидов, металлопротеиназ и реактивных радикалов кислорода, экспрессию адгезивных рецепторов, инфильтрацию тканей воспалительными нейтрофилами, моноцитами, лимфоцитами, вызывает пролиферацию резидентных клеток, накопление экстрацеллюлярного матрикса, являясь таким образом важнейшим патогенетическим медиатором развития выраженного воспалительного процесса [35,275].

Естественным ингибитором ИЛ-1 является антагонист рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1ра). Баланс между ИЛ-1 и ИЛ-1ра является важным регуляторным механизмом ограничения воспалительного процесса. ИЛ-1ра – 17кДа продукт миелопоэтических клеток, обладает структурной гомологией с ИЛ-1 α и ИЛ-1 β и конкурирует с ИЛ-1 за связывание с рецепторами I и II типов [32]. Рецептор I типа располагается на Т клетках, фибробластах и эндотелиальных клетках [65,121]. Рецептор II типа найден на В клетках, макрофагах и нейтрофилах [84]. ИЛ-1ра обладает различной способностью блокировать эти рецепторы. ИЛ-1ра блокирует рецептор I типа в эквимольных концентрациях, в то время как для блокады рецептора II типа требуется в 10-50 раз большее количество. В исследованиях *in vitro* показано, что для блокады клеточного ответа на 50% необходимы концентрации ИЛ-1ра, превосходящие ИЛ-1 в 10-500 раз [43]. Экспрессия ИЛ-1ра локально в очаге воспаления в воспалительных моноцитах/макрофагах, а также в резидентных клетках увеличивается под действием как противовоспалительных, так и провоспалительных медиаторов: ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-13, ТФР- β , а также ИЛ-1, липополисахаридов [97,232,283,326]. ИЛ-1 и ИЛ-1ра могут одновременно

продуцироваться моноцитами, что связано с активацией различных сигнальных путей. Наиболее важным сигнальным путем, вовлеченным в контроль ИЛ-1 и ИЛ-1 α в моноцитах человека, является фосфатидилинозитид-3-киназа, ее ингибция приводит к повышению уровня ИЛ-1 α и значительному снижению ИЛ-1 [208].

Показано, что экспрессия ИЛ-1 α повышается при различных воспалительных заболеваниях, в том числе и при гломерулонефрите, и при введении экспериментальным животным подавляет прогрессирование гломерулонефрита [163,164]. В здоровых почках крыс экспрессия ИЛ-1 α не определяется, однако она существенно увеличивается при нефрите. В модели анти-БМК-нефрита пик экспрессии ИЛ-1 достигается через 6 часов после индукции заболевания и персистирует до 96 часов (до 4 суток). Через 6 часов количество эндогенного ИЛ-1 α становится в 10 раз больше, чем ИЛ-1, а позднее достигает 20-кратного превышения. Но, несмотря на многократное повышение, этого количества эндогенного ИЛ-1 α оказывается недостаточно для подавления ИЛ-1-индуцированного воспаления в этой модели [298]. Установлено, что для достижения провоспалительного эффекта ИЛ-1 должно быть связано менее 5% рецепторов, в то время как для протективного эффекта ИЛ-1 α должны быть блокированы почти все рецепторы интерлейкина-1 (более 95%) [33].

В исследовании Rauta и соавт. уровень экскретируемого с мочой ИЛ-1 α был ниже у больных IgA нефропатией, чем у здоровых лиц. Значения экскреции ИЛ-1 α и ИЛ-1 не коррелировали с уровнем протеинурии, длительностью болезни и гистологической картиной в биоптатах почки. Однако при более высоком индексе ИЛ-1 α /ИЛ-1 у больных IgA-нефропатией накопление мезангиального матрикса, а также степень интерстициального воспаления и фиброза были менее выражены, чем при низком или нормальном показателе ИЛ-1 α /ИЛ-1 β . Низкий индекс ИЛ-1 α /ИЛ-1 был отмечен в основном у больных мужского пола, имевших худший прогноз при IgA нефропатии [254]. Отмечено, что продукция ИЛ-1 α у женщин выше, чем у мужчин, что связывают с увеличением экспрессии ИЛ-1 α под влиянием женских половых гормонов, это обеспечивает дополнительный

противовоспалительный потенциал ткани почек у женщин по сравнению с мужчинами [265]. У больных протеинурическими формами IgA нефропатии повышенные концентрации ИЛ-1 α в сыворотке крови и моче определяли хороший ответ на иммуносупрессивную терапию и меньший риск возникновения нарушения функции почек [361].

Результаты исследования полиморфизма генов ИЛ-1 α продемонстрировали значение аллеля-2 ИЛ-1 α (IL1RN-2) как предиктора развития заболеваний почек, а также их прогрессирующего течения [187]. Так, носители аллеля IL1RN-2 характеризуются низкой степенью продукции (низкие продуценты) защитного ИЛ-1 α моноцитами в ответ на воспалительные стимулы при сохранении уровня продукции провоспалительного ИЛ-1 [182]. У гомозиготных носителей этого аллеля развиваются прогрессирующие заболевания почек с быстрым формированием терминальной ХПН - в среднем 1,5 и 2,2 года при гломерулонефрите и диабетической нефропатии соответственно [52,108]. Низкие показатели ИЛ-1 α в сыворотке крови отмечались у больных системной красной волчанкой с развитием нефрита, в отличие от повышенных концентраций этой молекулы в остальных группах больных без поражения почек, что отражает важную протективную роль ИЛ-1 α в защите почек от иммуно-опосредованного повреждения [291].

Эффект введения ИЛ-1 α был оценен в наиболее тяжелой экспериментальной модели гломерулонефрита – анти-БМК-нефрита с образованием полулуний. Введение ИЛ-1 α профилактически перед индукцией нефрита приводит к снижению экспрессии адгезивных молекул LFA-1 и ICAM, хемокина MIP-2, уменьшению клеточной инфильтрации клубочков, количества полулуний, капиллярных тромбов в клубочках, а также инфильтрации в тубулоинтерстиции. Эти иммунопатологические изменения коррелируют со снижением величины протеинурии и предотвращением нарушения функции почек [134, 165,296,300]. Торможение экспрессии адгезивной молекулы ICAM-1 под действием ИЛ-1 α происходит в мезангиальных клетках и эндотелии

гломерулярных капилляров, но наибольшая супрессия отмечается в тубулоинтерстиции: эндотелии перитубулярных капилляров и на люминальной поверхности клеток проксимальных канальцев, что сопровождается выраженным уменьшением макрофагальной инфильтрации этого отдела. По-видимому, интерлейкин-1 является главным активатором экспрессии ICAM-1 и привлечения моноцитов/макрофагов в тубулоинтерстиций [227].

Введение ИЛ-1 α главным образом предотвращает развитие клеточно-опосредованного повреждения ткани почки, так как тормозит развитие поздней аутологичной фазы анти-БМК-нефрита [227]. Введение ИЛ-1 α с момента индукции до 14 дня анти-БМК-нефрита у крыс предотвращало развитие выраженного воспаления и отека, гиперклеточности клубочка, атрофии клубочков и образование полулуний, а также снижение или предотвращение тубулярной атрофии и интерстициального фиброза с сохранением функции почек [165]. При лечении ИЛ-1 α уже развившегося анти-БМК-нефрита (с 7 дня заболевания) отмечались стабилизация протеинурии, исчезновение гематурии и постепенное восстановление почечной функции. При гистологическом исследовании – уменьшение количества полулуний, пролиферации клеток клубочка, степени гломерулосклероза, тубулярной атрофии и интерстициального фиброза. Таким образом, введение ИЛ-1 α экспериментальным животным может предотвращать развитие анти-БМК-нефрита, а также тормозить прогрессирование уже развившегося заболевания [165].

ИЛ-1 α является эндогенным протективным фактором, направленным на ограничение следующих патологических процессов в почке: экспрессии адгезивных молекул и, следовательно, лейкоцитарной инфильтрации почечной ткани, пролиферации резидентных клеток (мезангиальных и тубулярных) и активации иммунных клеток. ИЛ-1 α подавляет продукцию цитокинов – ФНО- α , ТцФР, ТФР- β , а также накопление компонентов экстрацеллюлярного матрикса [61], оказывая противовоспалительное, антипролиферативное, антисклеротическое действие. Лечение ИЛ-1 α экспериментального нефрита (как

в раннюю, так и в позднюю фазу заболевания) почти полностью блокирует интерстициальную макрофагальную инфильтрацию и снижает тубуло-интерстициальное повреждение, предотвращая нарушение функции почек.

Перспективными являются методы повышения локальной экспрессии ИЛ-1 α в ткани почки, это позволит добиться большей эффективности, чем системное назначение рекомбинантного белка [190]. Используя технологии генного переноса с применением мезангиального вектора для введения гена ИЛ-1 α , показано, что клубочки, экспрессирующие трансгенный ИЛ-1 α , приобретают резистентность к ИЛ-1 [349].

1.4.1.2 Инактиваторы лейкоцитов и резидентных клеток: ИЛ-10

Одним из патологических признаков гломерулонефрита является лейкоцитарная инфильтрация ткани почки. Инфильтрат представлен главным образом моноцитами/макрофагами, в меньшей степени нейтрофилами и Т-лимфоцитами. Инактиваторами воспалительных лейкоцитов могут являться некоторые медиаторы, включая пептидные факторы и биоактивные липиды. Баланс между факторами воспаления и их эндогенными инактиваторами определяет характер течения воспалительного ответа в ткани почки – в сторону разрешения/выздоровления или в сторону дальнейшего прогрессирования при гломерулонефрите. Помимо клеток инфильтрата активированные резидентные клетки могут принимать участие в разрешении воспаления, продуцируя ряд защитных медиаторов аутокринным путем. Эти механизмы ауторегуляции имеют важное значение в контроле воспалительного процесса в ткани почки.

ИЛ-10 (37кДа) многофункциональный противовоспалительный цитокин, который играет важную регуляторную роль в ограничении воспалительного процесса. Секреция ИЛ-10 происходит отсрочено, через несколько часов после выделения провоспалительных факторов [288]. Это свидетельствует о том, что сочетание агрессивных провоспалительных факторов с отсроченной секрецией ИЛ-10 обеспечивает саморегуляцию процесса воспаления и торможение

воспалительного ответа через некоторое время. Основными стимулами для синтеза ИЛ-10 являются провоспалительные молекулы - иммунные комплексы, липополисахариды, простагландины, катехоламины, цитокины, главным образом ФНО- α , ИЛ-1 β [290,292,334]. Секреция ИЛ-10 вне действия воспалительных факторов, по-видимому, происходит очень редко. В эксперименте *in vivo* показано, что этот цитокин могут секретировать различные подтипы иммунных клеток - Т- и В-клетки, макрофаги, дендритные клетки и другие. Однако главными продуцентами ИЛ-10 считают Трегуляторные (CD4CD25) клетки и альтернативные макрофаги, обладающие противовоспалительным потенциалом [34]. ИЛ-10 может воздействовать на воспаление ауто- и паракринным путем локально или на системном уровне воспаления.

ИЛ-10 является продуктом секреции Th2 (Тхелперов 2 типа) лимфоцитов наряду с рядом других цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13). Эти Th2 цитокины подавляют активацию Th1 клонов, продуцирующих ФНО- α , ИЛ-2 и интерферон- γ и ведущих к активации клеточного типа повреждения (цитотоксических Т-лимфоцитов, макрофагов, комплемента) [60]. Вследствие этого повышение секреции ИЛ-10 подавляет Th1 путь и сдвигает баланс преимущественно в сторону Th2 пути, с выработкой противовоспалительных цитокинов [16]. Помимо Th2 существуют Т регуляторные клетки (Tr1 и CD4+CD25+), продуцирующих ИЛ-10, которые могут подавлять как Th1, так и Th2 ответ.

В мононуклеарных клетках ИЛ-10 ингибирует продукцию интерлейкинов - 1,6 и фактора некроза опухолей- α , гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (76), реакции перекиного окисления, и выработку простагландинов [203]. ИЛ-10 снижает продукцию хемотаксических факторов, таких как ИЛ-8 или СС-хемокины, уменьшая приток лейкоцитов в область воспаления [233]. ИЛ-10 уменьшает продукцию литических ферментов моноцитов, таких как матриксные металлопротеиназы, и супероксид-анионы [160]. Супрессивный эффект ИЛ-10 оказывает также на полиморфно-ядерные лейкоциты [56], эозинофилы, тучные, дендритные клетки [146]. В ткани почки интерлейкин-10 продуцируется в очаге

воспаления, например, в нефритических клубочках [162]. Резидентные клетки почечной ткани, приобретая противовоспалительный фенотип, способны также продуцировать ИЛ-10 [95].

Так как транскрипция всех воспалительных белков находится под контролем ядерного фактора κB (NF κB), полагают, что противовоспалительный эффект ИЛ-10 опосредуется связыванием с NF κB [331] : ИЛ-10 ингибирует активность ИКК и блокирует связывание NF κB с участком ДНК в ядре.

При тяжелых формах ГН, включая редкие формы мембранозной нефропатии с полулуниями, независимо от причины заболевания активируется преимущественно Th1-зависимый ответ по типу гиперчувствительности замедленного типа. Определена ведущая роль Th1 клеточного механизма в повреждении почки при быстро прогрессирующем нефрите с полулуниями [54,198]. Анализ цитокинового профиля в биоптатах почек больных выявил более высокий уровень цитокинов Th1 (ИЛ-2, интерферона- γ) при различных формах пролиферативного нефрита, по сравнению с непролиферативными формами ассоциированы с неполным Th2 ответом. Дефицит ИЛ-10 определяется также у пациентов с хронической посттрансплантационной нефропатией и у пациентов с хроническим тубуло-интерстициальным нефритом [5, 14].

Полученные данные свидетельствуют о важной роли ИЛ-10 как основного Th2 цитокина и продукта регуляторных Т-регуляторных клеток в защите почки от пролонгированного повреждения, при его дефиците развиваются наиболее тяжелые, прогностически неблагоприятные формы заболевания почек.

1.4.1.3 ИЛ-10 в лечении экспериментального гломерулонефрита

Эффективность применения ИЛ-10 для лечения гломерулонефрита была изучена в экспериментальных моделях. Fouqueray В. и соавт. оценили терапевтическую роль ИЛ-10 при нефротоксическом сывороточном нефрите – заболевании, ассоциированном с преимущественным Th1-иммунным ответом, характеризующимся пролиферацией мезангиальных клеток, инфильтрацией

клубочков лейкоцитами и макрофагами. У крыс, получивших ИЛ-10 профилактически - за сутки до инициации нефрита, величина суточной протеинурии была на 75% ниже, чем в контроле. При введении мезангиального генного вектора ИЛ-10 после развития нефрита получен слабый эффект, протеинурия уменьшилась на 23%. Однако при использовании другой техники введения гена ИЛ-10 – с использованием ДНК-содержащих HVJ-липосом, удалось уменьшить величину протеинурии на 55% [95,96].

В модели нефрита у мышей назначение ИЛ-10 успешно предотвращало образование полулуний в клубочках, отложения фибрина, накопление Т лимфоцитов и макрофагов и приводило к снижению протеинурии и улучшению функции почек [301]. Исследования эффекта экзогенного ИЛ-10 при экспериментальном анти-Thy1 мезангиопролиферативном нефрите подтвердили не только противовоспалительную, но и антипролиферативную роль ИЛ-10. Введение ИЛ-10 привело к уменьшению пролиферации мезангиальных клеток, экспрессии ИЛ-1 β и ICAM-1 в клубочках [147]. У крыс через сутки после однократного введения ИЛ-10 отмечалось значительное снижение инфильтрации клубочков макрофагами ($\downarrow$ CD14) и сохранения целостности клубочка ($\downarrow$ MMP). В этом исследовании показано, что несмотря на короткий период полураспада (около 2мин), ИЛ-10 может оказывать действие даже через 24 часа после однократного внутривенного введения [251].

Человеческий рекомбинантный ИЛ-10 (илдекакин/Теновил) протестирован у здоровых лиц и у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями: болезнью Крона, ревматоидным артритом, псориазом и после трансплантации. ИЛ-10 в дозе до 25 μ г/кг хорошо переносится и не имеет серьезных побочных эффектов, в дозе до 100 μ г/кг у отдельных лиц отмечается гриппоподобный синдром слабой или умеренной степени выраженности [209].

1.4.1.4 *Роль регуляторных иммунных клеток в механизмах «самозащиты почки»*

Некоторыми работами последних лет показано, что некоторые клетки воспалительного инфильтрата играют защитную /протективную роль (регуляторные Т лимфоциты, альтернативные макрофагов и дендритные клетки) в процессе воспаления, в том числе почечного. Так, например, при пуромидин-аминогликозидном нефрозе (PAN) у кроликов установлено, что отдельные подтипы CD4⁺ Т клеток являются протективными, блокируют эффекторные Т лимфоциты и тормозят развитие воспаления, удаление CD4⁺ клеток приводит к большему повреждению ткани почки [331].

CD4⁺CD25⁺ (Трег) наиболее хорошо одновременно изученный подтип регуляторных лимфоцитов. Трег, дифференцировка которых происходит в тимусе, называют «натуральными». CD4⁺ клетки, которые становятся Трег на периферии, относятся к «адаптивным» Трег. Основная функция Т регуляторных клеток — обеспечение иммунологической толерантности к собственным антигенам, что имеет особенно важное значение при аутоиммунных заболеваниях. Основным регулятором дифференцировки этого фенотипа клеток является транскрипционный фактор forkhead box P3 (FoxP3). При заболеваниях почек адаптивные регуляторные клетки играют важную роль. Трег могут оказывать подавлять активацию эффекторных и цитотоксических Т-лимфоцитов либо прямо, либо опосредованно с помощью активации выработки противовоспалительных цитокинов [234,270]. Трег могут влиять также и на ряд других иммунных клеток в инфильтрате (макрофагов, дендритных клеток, В-лимфоцитов и нейтрофилов, способствуя изменению провоспалительного фенотипа на противовоспалительный [105,175,180, 204, 295].

Показана протективная роль Трег клеток при клеточно-опосредованном повреждении почечной ткани в модели анти-БМК-нефрита [339]. При введении CD4⁺CD25⁺ мышам с нефритом функциональные и гистологические признаки

почечного повреждения значительно уменьшаются по сравнению с таковыми у мышей, которым вводились CD4+CD25- Т клетки.

Другими важными клетками воспалительного инфильтрата, которые могут определять исход воспалительного процесса, являются макрофаги. Хорошо известна роль макрофагов в механизмах прогрессирования заболеваний почек, однако появились данные о том, что макрофаги могут иметь протективное значение в процессе репарации почечной ткани после повреждения при иммунных и неиммунных заболеваниях почек. Было установлено, что при воспалении в инфильтрате могут одновременно сосуществовать функционально различные популяции макрофагов. Наряду с активированными классическим путем M1 макрофагами, секретирующими провоспалительные медиаторы Th1 иммунного ответа, существует и другой тип макрофагов, которые секретируют противовоспалительные цитокины, ингибируют пролиферацию Т клеток, запускают ангиогенез и играют роль в заживлении и тканевом ремоделировании. Они относятся к «альтернативному» фенотипу – M2. Альтернативный путь активации макрофагов происходит под действием Th2 цитокинов, а также иммунных комплексов в комбинации с ИЛ-1 β или ЛПС, а также при добавлении ИЛ-10, ТФР- β , глюкокортикоидов [107,148,192,193,194,196]. В результате формируется M2 иммунорегуляторный, иммуносупрессивный фенотип, который участвует в разрешении воспалительного процесса и репарации [192,329]. M2 макрофаги подавляют секрецию провоспалительных медиаторов иммунными клетками, а также характеризуются повышенной способностью к фагоцитозу и усиленной продукцией противовоспалительных и трофических факторов: секретируют ИЛ-1 α , аргиназу-1 (тормозящую продукцию NO), ТФР- β [213,338].

При повреждении постоянное привлечение макрофагов под действием различных цитокинов и факторов роста является физиологическим процессом и способствует заживлению. Однако инициальный процесс заживления может стать патологическим и развиваться по пути необратимого фиброза и нарушения структуры ткани. Прогрессирование иммуно-опосредованного почечного

заболевания зависит от взаимодействия дендритических клеток, макрофагов и Т-клеток инфильтрата [59,132,161]. Например, дифференциация Т-клеток преимущественно в Th1 приводит к классической активации макрофагов и выработке провоспалительных медиаторов повреждения, развитию гиперчувствительности замедленного типа и образованию полулуний. Наоборот, модуляция фенотипа макрофагов с переходом на альтернативный фенотип M2 под действием противовоспалительных факторов уменьшает повреждение почки при гломерулонефрите [26, 348], отторжении трансплантата [345] и интерстициальном фиброзе [228]. Так, Wang и соавт. показали, что поляризация макрофагов *ex vivo* и введение M2 мышам с воспалительными заболеваниями уменьшает повреждение тканей и стимулирует заживление. Введение M2 макрофагов в почку мышам через 5 дней после индукции заболевания в значительно большей степени защищало ткань почки от повреждения, чем у контрольных мышей. Хотя введенные противовоспалительные макрофаги составляют всего лишь 15% всех макрофагов, изученных в клубочке, они значительно снижают инфильтрацию и активацию собственных макрофагов клубочков [329, 336,337].

Таким образом, процессы иммунного воспаления представляют собой постоянное балансирование между повреждением клеток и пролиферацией, накоплением интерстициального матрикса и ремоделированием ткани. В том числе резидентные клетки почечной ткани обладают внутренними резервами для самовосстановления и разрешения воспаления.

1.4.2 Внутриклеточная защита: белки теплового шока

Белки теплового шока (БТШ) относятся к высококонсервативным молекулам, которые выполняют ряд защитных функций, включая цитопротекцию, внутриклеточный синтез и сборку белков [116]. БТШ могут играть важную роль во внутри- и внеклеточной защите почечной ткани. Конституционально экспрессирующиеся белки контролируют созревание и обмен внутриклеточных

белков и играют важную роль в поддержании целостности клетки. Внутри клетки БТШ участвуют в формировании вторичной и третичной структуры внутриклеточных белков, а также в процессах восстановления или удаления поврежденных, денатурированных белковых молекул или их агрегатов, токсичных для клетки. Индуцируемые белки синтезируются в ответ на повреждение: воспаление, ишемию, оксидантный стресс [181,245]. Они главным образом играют роль внутриклеточных шаперонов [6]. Однако при хроническом воспалении эти белки могут высвобождаться из клеток и выполнять ряд иммунорегуляторных функций.

Регуляция синтеза БТШ в клетке осуществляется путем взаимодействия фактора транскрипции БТШ (HSF1) с Hsp элементом соответствующего гена-промотора [319]. HSF1 существует в цитоплазме клетки в виде латентной мономерной молекулы. Под влиянием факторов повреждения усиливается внутриклеточный ток вновь синтезированных неструктурированных белков, что приводит к активации фосфорилирования HSF1 митоген-активированной протеинкиназой с образованием трехмерной структуры HSF1 [141]. Этот тример транслоцируется в ядро, связывается с ДНК гена-промотора Hsp и обеспечивает транскрипцию соответствующего белка [245]. БТШ подразделяются на несколько семейств в соответствии с молекулярным весом. Выделяют малые БТШ (16-40 kDa), БТШ 40, БТШ 60, БТШ 70, БТШ 90, БТШ 100 семейства. Многие БТШ экспрессируются в норме в ткани почки, после повреждения уровень их экспрессии изменяется [46].

1.4.2.1 Белки теплового шока 27

Малые (низкомолекулярные) БТШ – это группа белков, различающихся по молекулярной массе, которая варьирует от 16 до 40 кДа. Эти белки играют важную роль в поддержании нормального функционирования и стабилизации актинового цитоскелета клетки [166,170]. Среди малых БТШ важную протективную функцию в ткани почки выполняет БТШ 27 (БТШ 27 у человека, БТШ 25 – у мышей). В клетке сосуществуют одновременно более крупные

молекулы БТШ 27, которые выполняют функцию белков-шаперонов (белков-«нянек») и менее крупные олигомеры БТШ27, которые ассоциированы с актиновыми волокнами клеток (актин-ассоциированные белки), которые стабилизируют актиновые филаменты при повреждении, в том числе при воздействии провоспалительных факторов [125,202,249]. Наибольшее протективное значение имеют нефосфорилированные олигомеры БТШ27, после фосфорилирования р38МАР киназой происходит их связывание с актиновыми микрофиламентами и ремоделирование актиновой сети в клетке. Кроме того, белок теплового шока 27 играет важную роль в ингибции апоптоза клеток [8].

Низкомолекулярные БТШ могут выполнять протективные функции во многих отделах почечной ткани. В норме в почечной ткани БТШ27 экспрессируется в эндотелии, в апикальной части тубулярного эпителия проксимальных канальцев, в концевой части собирательных трубочек [230].

В клетках мозгового слоя обнаруживается выраженная экспрессия БТШ 27, что связано с защитой клеток от осмотического повреждения в гипертонической среде [226]. Высокая экспрессия БТШ27 во внутрипочечных артериях и артериолах предполагает участие БТШ27 в регуляции сосудистого тонуса [216]. Интенсивное окрашивание БТШ25/27 в щеточной каемке проксимальных канальцев также отражает эффект этого белка в ремоделировании актиновых филаментов в этом клеточном домене [273].

Увеличение содержания дефосфорилированного БТШ 27 блокирует перестройку актинового цитоскелета, стабилизируя его, и повышает устойчивость клетки к повреждению. БТШ27 в клубочках почек почти полностью локализуется в подоцитах, которые имеют хорошо развитый актиновый цитоскелет. Механизмы повреждения актинового цитоскелета подоцитов под действием провоспалительных факторов в настоящее время уточняются. Предполагают, что повреждение подоцита различными факторами воспаления сопровождается дефицитом аденозинтрифосфата (АТФ) в клетке, дефосфорилированием адгезивных белков и агрегацией (или распадом) актиновых микрофиламентов

цитоскелета [302]. Еще одной причиной, приводящей к повреждению подоцита в условиях дефицита АТФ, является первичная патология его актинового цитоскелета, обусловленная генетическими особенностями [268].

В физиологических условиях БТШ27, располагаясь внутриклеточно, не связан с волокнами актина. При повреждении клетки дефосфорилированные формы БТШ27 образуют более тесные связи с актином клетки, тем самым стабилизируя внутриклеточные микрофиламенты и цитоскелет подоцитов и тубулярных клеток в почке, в результате чего клетки становятся более устойчивыми к стрессорным воздействиям [202, 249]. Процесс фосфорилирования БТШ-27 митогенактивированными киназами сопровождается отщеплением БТШ27 от актиновых микрофиламентов, ремоделированием актиновой сети, агрегацией и перераспределением микроволокон в клетке и распластыванием ножек подоцита, что рассматривают как патофизиологическую основу гломерулярной проницаемости [249].

Процесс распластывания малых отростков подоцитов (ножек) тесно связан с актиновым цитоскелетом клетки, следовательно БТШ 27 играет важную роль в сохранении целостности отростков подоцитов в процессе повреждения. Smoyer и соавт. в эксперименте у крыс продемонстрировали значительное повышение экспрессии БТШ 27. При индукции нефротического синдрома отмечалось повышение экспрессии и фосфорилирования гломерулярного БТШ 27 [284,285].

Количество фосфорилированных форм БТШ27 в подоцитах повышалось при диабетической нефропатии у животных [40]. Более того, индукция экспрессии БТШ 27 имела протективное значение в отношении подоцитов, которые подвергались воздействию высокой концентрации глюкозы и ангиотензина II [267].

Повышение гломерулярной экспрессии БТШ 27 было отмечено при нефропатиях, проявляющихся протеинурией и нефротическим синдромом: диабетическая нефропатия и ФСГС, а также у больных с гипертонической нефропатией [267]. В исследовании Tsagalis et al. была определена важная роль

БТШ27 в обеспечении внутриклеточной защиты при волчаночном нефрите у человека. Повышенная экспрессия БТШ27 отмечена преимущественно в резидентных клетках почечной ткани (гломерулярных и тубулярных), а не в клетках воспалительного инфильтрата, свидетельствуя о процессе активации внутриклеточной «защиты». Экспрессия БТШ27 в ткани почки была особенно высокой при диффузном пролиферативном нефрите и коррелировала с индексами активности и уровнем креатинина сыворотки крови. В случаях менее выраженного воспаления не было выявлено повышения экспрессии БТШ27 в клубочках почек. По-видимому, напряженность цитопротективного ответа при нефрите зависит от тяжести повреждения/воспаления [307].

Повышение уровня БТШ27 в моче и сыворотке крови выявлено у пациентов с 3-5 стадией хронической болезни почек [168,219]. Авторы предполагают, что повышение экскреции БТШ 27 с мочой является следствием повышения его количества в клетках почки [168].

В сыворотке крови больных СКВ положительный уровень антител к низкомолекулярным БТШ: пептиду убиквитина 22-45 цистеин и пептиду убиквитина 42-76 был выявлен в 21,7% и 24,1% случаев соответственно [9].

1.4.2.2 Белки теплового шока 70 (БТШ 70)

БТШ 70 имеет широкий спектр протективных функций как внутриклеточный шаперон: его обязательной ролью в клетке является формирование вторичной структуры белков, транспорт, деградация, транслокация в различные отделы клетки, восстановление поврежденной структуры белка, предотвращение необратимой агрегации с другими белками и удаление необратимо поврежденных белков [46].

Семейство БТШ 70 состоит из БТШ 73 и БТШ 72. БТШ 73 (известный как БТШ -70 cognate protein, HSC70) является конституциональным членом семейства БТШ70, который постоянно (конституционально) выявляется во всех отделах

нефрона. Интенсивное изучение локализации и функции БТШ70 в почке началось в начале 90-х годов.

Komatsuda и соавт. изучили локализацию БТШ 73 в ткани почек крыс в норме. В ткани почки крыс БТШ 73 экспрессируется в подоцитах, Боуменовых капсулах, тубулярно эпителии проксимальных канальцев, собирательных трубочек и в интерстиции. Небольшое количество БТШ 70 необходимо для участия в процессе синтеза и деградации белков. При РАН количество БТШ 70 нарастает в клетках мезангия, канальцев и собирательных трубочек, возможно вследствие повышения реабсорбции белка и отражает протективный ответ на повреждающие компоненты протеинурии [151]. Несколько иная локализация экспрессии HSP70 была показана в нормальной ткани почки в работах Venkataseshan и Dinda и соавт. [80, 315]. Гранулярная цитоплазматическая экспрессия БТШ 73 выявлена в подоцитах и эпителии дистальных собирательных трубочек, но не проксимальных канальцах.

Morita и соавт. описали повышение уровня БТШ 73 после ишемии почки в цитоплазме поврежденных клеток эпителия проксимальных канальцев [212]. При гентамицин-индуцированном остром канальцевом повреждении БТШ 73 из ядра перераспределяется в цитоплазму клеток и накапливается в лизосомах, возможно, для участия в деградации поврежденных белков [150]. Экспрессия БТШ 73 также повышает устойчивость клеток к апоптозу при оксидантном стрессе [350].

БТШ 72 относится к индуцируемым белкам, однако его экспрессия отмечена также и в норме. Еще в начале 90-х годов было показано, что экспрессия БТШ 72 повышается в культуре клеток почек (MDCK) в ответ на повышение внеклеточной осмолярности [67, 72]. В этом случае перестройка цитоскелета и экспрессия БТШ может являться компонентом регуляторной системы, вовлеченной в адаптацию клеток мозгового слоя к осмотическому стрессу. O'Neill S и соавт. обнаружили БТШ 72 в корковом слое почки (в отдельных собирательных трубочках) и мозговом веществе почки. Все канальцы были слабо окрашены в наружном слое, в то время как интенсивное окрашивание отмечено в

сосочках собирательных трубочек и в уротелии [230]. В области мозгового вещества почки и области почечных сосочков отмечается высокая концентрация осмотически активных веществ – электролитов и мочевины, что и объясняет более интенсивную экспрессию БТШ72 именно в этих отделах ткани почки [226].

БТШ 70 высвобождается в экстрацеллюлярное пространство и, следовательно, в микроциркуляцию [41, 218], поэтому этот белок выявляется в сыворотке крови. Повышенная экспрессия БТШ 72 в ткани почки сопровождается повышением экскреции этого белка с мочой, следовательно, исследование БТШ 72 в моче может быть использовано для оценки степени почечного повреждения. Наибольшее количество исследований в настоящее время посвящено изучению экспрессии БТШ72 в ткани почки при остром почечном повреждении, в том числе ишемическом. Например, повышение экскреции БТШ 72 возникает за 3-4 дня до развития острого почечного повреждения у больных реанимационных отделений [210]. Yilmaza A. и соавт. продемонстрировали, что БТШ 70 может быть ранним маркером диабетической нефропатии и нарастать по мере прогрессирования болезни [347]. Быстрое увеличение экскреции БТШ 72 с мочой происходит у больных после трансплантации почки, свидетельствуя о степени повреждении тубулярного эпителия после почечной ишемии [215]. У больных с терминальной почечной недостаточностью также отмечено значительное повышение уровня БТШ 70 в моче [168]. Экспрессия БТШ 72 резко возрастает при ишемическом и токсическом повреждении ткани почки [36, 87, 273, 314, 333].

В последнее время количество работ по изучению HSPs при ишемическом почечном повреждении постоянно расширяется (пополняется), результаты этих исследований имеют важное значение с позиции таргетного воздействия и модуляции БТШ [142, 231, 332]. Исследования, посвященные изучению роли БТШ70 при ХГН, немногочисленны. Так, при иммуногистохимическом исследовании ткани почек больных непролиферативными формами нефрита гранулярное окрашивание Hsp 72/73 слабой интенсивности выявлено в висцеральных эпителиальных клетках, клетках канальцев и собирательных

трубочек. Слабая экспрессия БТШ 72 выявлена и в нормальной ткани почки и у больных волчаночным нефритом [81,307,315]. Однако, при остром интерстициальном нефрите и ХГН в интерстициальных инфильтратах ткани почки экспрессия БТШ 70 увеличивалась в значительной мере. В то же время при хроническом воспалении экспрессия БТШ 70 значимо не отличалась от нормы [315].

Индукцированная экспрессия БТШ 72 ограничивает процесс апоптоза клеток почек, подавляя активность Akt киназы, которые регулируют проапоптотический протеин Вах. БТШ 70 уменьшает накопление Вах в митохондриях, уменьшает экспрессию каспаз и ингибирует апоптоз [332]. БТШ 70 может ограничивать провоспалительный NF-κB сигнал путем блокирования NF-κB p65 транслокации в ядро [332] (рис. 1). БТШ72 влияет на хроническое тубуло-интерстициальное воспаление не только, подавляя апоптоз тубулярных клеток. БТШ 72 ингибирует эпителиально-мезенхимальную трансформацию в ответ на TGF-β (рис. 2), уменьшая количество миофибробластов, накопление коллагена I типа и фиброза [195]. Индукция экспрессии БТШ 70 ингибирует оксидантный стресс за счет воздействия на MEK/ERK сигнальный путь [3, 333, 360]. С другой стороны, БТШ 70 подавляет фосфорилирование стрессовых MAPK (JNK and p38 MAPK), что, в свою очередь, вызывает ингибирование апоптоза и синтеза провоспалительных Th1 –цитокинов. (рис. 3)

1.4.2.3 Роль БТШ 70 в T клеточной регуляции хронического воспаления

Белок теплового шока 70 обладает широким спектром плеiotропных эффектов в ткани почки. В первую очередь хорошо известны его эффекты как белка-шаперона. Однако БТШ70 оказывает мощное противовоспалительное действие, влияя на внутриклеточные киназы и синтез провоспалительных цитокинов через NFκB. Кроме того, не менее важной является его иммунорегуляторная функция, то есть участие в механизмах контроля над процессами иммунного воспаления. [42, 308].

Белок теплового шока 70 является иммунодоминантным белком. Это означает, что пептиды микробных БТШ 70 являются эпитопами для активации иммунного ответа к бактериальным инфекциям (136). Однако иммунный ответ к похожим эпитомам БТШ 70 человека и микроорганизмов может лежать в основе аутоиммунных реакций (189). Рядом исследований продемонстрировано, что в сыворотке крови больных различными аутоиммунными заболеваниями повышен уровень анти-БТШ70-антител, например, при системной красной волчанке, сахарном диабете, ревматоидном артрите, при трансплантации органов [7,49,78, 102, 303, 340].

Внутриклеточные белки теплового шока в норме и при повреждении могут выходить за пределы клетки во внеклеточное пространство или экспрессироваться на мембране клеток (41,218). Эти белки распознаются клетками иммунной системы, в первую очередь Т-лимфоцитами, что запускает процесс амплификации клона Т регуляторных лимфоцитов [29] - фенотипа, продуцирующего противовоспалительный ИЛ-10 [74, 75, 355, 356]. Именно с помощью иммунорегуляторных Т регуляторных клеток и продуцируемого ими интерлейкина -10 белки теплового шока 70 опосредуют свои иммунорегуляторные функции. Например, введение БТШ70 животным в эксперименте сопровождалось увеличением Трег клеток в очаге воспаления [356]. Взаимодействие поверхностных эпитопов БТШ 70 с иммунными клетками происходит через Toll-like рецепторы (TLR), Активация клона регуляторных лимфоцитов CD4⁺CD25⁺, осуществляется через TLR-4 [150,310]. Kim и соавт (2014) показали, что в процессе теплового preconditionирования повышение БТШ 70 в CD11c⁺ дендритических клетках усиливает Т-рег протективный эффект и противовоспалительный ответ (рис. 4).

БТШ обладают способностью изменять фенотип целого ряда иммунных клеток. Помимо Т-клеток, моноциты и дендритные клетки под действием БТШ 70 и 60 могут приобретать противовоспалительный фенотип [77]. Так, в клинических исследованиях у пациентов с хронической посттрансплантационной нефропатией

отмечено повышение секреции иммунными клетками периферической крови противовоспалительного ИЛ-10 при стимуляции белками теплового шока [55].

Обсуждалась роль БТШ в процессе удаления из очага воспаления активированных иммунных клеток и уменьшении воспалительной инфильтрации. Экспрессирующиеся на поверхности воспалительных нейтрофилов БТШ 70 распознаются БТШ-специфичными Т клетками ($\gamma\delta$ Т клетками), которые характеризуются продукцией цитокинов ИФ- γ , ИЛ-10, ФНО- α , а также непосредственной цитотоксической активностью в отношении нейтрофилов и макрофагов [117]. При развитии иммунного воспаления БТШ экспрессируются на поверхности активированных Т клеток, при этом могут распознаваться Т клеточными рецепторами (TCR) регуляторных Т клеток (CD4⁺ или CD8⁺), которые участвуют в элиминации активированных патологических Т клеточных клонов из очага воспаления [93].

Нарушение иммунорегуляторной функции БТШ70 может быть ассоциировано с хроническими воспалительными заболеваниями [253]. Так, при хронической болезни почек также был выявлен дефицит экспрессии БТШ27 на поверхности циркулирующих иммунных клеток – моноцитов в отличие от здоровых лиц. Степень этих нарушений была наиболее выражена у больных с хронической почечной недостаточностью, то есть в группе с ярко выраженным хроническим воспалением [197].

Особый интерес представляет установленный еще в 1998г. факт, что в крови здоровых лиц также циркулируют БТШ-специфичные Т регуляторные клетки [246, 247]. Высказано предположение, что экспрессия БТШ на поверхности клеток необходима для нормального иммунного гомеостаза и «защиты» от хронических воспалительных заболеваний у здорового человека. При этом аутоиммунные реакции на собственные антигены БТШ70 не развиваются, что связано с постоянным присутствием в организме БТШ-70-специфичных Т рег клонов, стимуляция которых постоянно происходит в лимфоидной ткани кишечника под действием нормальной микрофлоры. В случае повреждения и

воспаления БТШ-специфичные регуляторные Т клетки проникают в очаг воспаления и участвуют в подавлении воспалительной реакции [62,266].

Таким образом, в конце 90х годов определена роль БТШ 70 в регуляции хронического иммунного воспаления. Рядом авторов (Pockley 2003, Hauet-Broere, van Eden 2006, de Kleer 2003,2004) была разработана концепция, согласно которой реактивность к собственным БТШ в большей степени подавляет процесс воспаления [75, 114, 245, 311] (рис. 4). БТШ предотвращают воспалительное повреждение и обеспечивают продукцию противовоспалительных цитокинов через расширение пула Т рег клеток. Учитывая протективную роль HSPs при хроническом иммунном воспалении, перспективным является таргетное воздействие на БТШ 70 при хроническом гломерулонефрите, однако это направление менее изучено и требует дальнейшей разработки.

1.4.3 Стратегии, направленные на усиление механизмов самозащиты почки

Альтернативой известным методам лечения заболеваний почек являются стратегии, направленные на укрепление механизмов почечной самозащиты. Они включают профилактическое введение, фармакологическую модуляцию и генетические манипуляции. Принцип профилактического введения основан на защитном эффекте различных предсостояний от дальнейшего повреждения. Так, например, короткий период ишемии ведет к резистентности различных органов к последующей тяжелой ишемии. В почках ишемическое прекондиционирование предотвращает значительное снижение клубочковой фильтрации после ишемии/реперфузии или интраартериального введения перекиси водорода [352]. Этот эффект объясняется индукцией по меньшей мере антиоксидантных ферментных систем – супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Поэтому короткие контролируемые введения провоспалительных цитокинов могут способствовать постоянной стимуляции «самозащиты» почки.

Ярким примером фармакологической модуляции эндогенной системы самозащиты является назначение глюкокортикоидов. Например, в исследованиях *in vitro* эндотелиальные и мезангиальные клетки клубочка, обработанные

метилпреднизолоном, продуцируют антиоксидантные супероксиддисмутазу и каталазу в значительно больших концентрациях, чем в контроле [138]. Таким образом, глюкокортикоиды участвуют в стимуляции эндогенных механизмов самозащиты, в частности антиоксидантных факторов.

Лечение препаратами цитокинов:

Усиление действия эндогенных цитокинов путем введения в организм природных или рекомбинантных молекул цитокинов является одним из перспективных методов терапевтического вмешательства при заболеваниях почек. Несмотря на успех применения противовоспалительных агентов в экспериментальных моделях нефрита, множество нерешенных вопросов являются препятствием для назначения этих препаратов для лечения гломерулонефрита у человека. Различия между экспериментальными моделями затрудняет трактовку результатов и перенос на потенциальную терапию у человека. Например, при применении ИЛ-10, потенциального иммуносупрессивного цитокина были получены хорошие результаты в модели гломерулонефрита у мышей, в то время как в модели ГН у крыс эффекта применения ИЛ-10 обнаружено не было [301]. Большое количество экспериментальных данных, демонстрирующих хороший протективный эффект естественных противовоспалительных медиаторов, получено при назначении этих агентов непосредственно перед индукцией нефрита или в раннюю фазу развития заболевания. В то же время у человека момент начала заболевания во многих случаях неизвестен, и лечение начинают уже при развившемся процессе. Кроме того, прогрессирование заболевания почек отмечают обычно при длительном наблюдении, несмотря на элиминацию этиологического фактора, а многие экспериментальные болезни имеют короткий период течения.

Особый интерес представляют повышение экспрессии отдельных противовоспалительных молекул с помощью генной инженерии. Этот способ лечения в некоторых случаях привел к лучшим результатам, чем введение рекомбинантных цитокинов, помимо этого, он позволяет преодолеть

нежелательные системные эффекты. В течение последних лет разработаны различные способы переноса экзогенных генов во взрослую почку.

Перенос генов в клубочки

Введение чужеродных генов в клубочки возможно через почечный кровоток. Например, перенос гена осуществляется липосомным методом с введенным гемагглютинирующим вирусом (HVJ). ДНК, ядерный белок и липиды конъюгируются в виде липосом. Такие липосомы быстро проникают через плазматическую мембрану эндотелиальных клеток при взаимодействии HVJ гликопротеинов с сialовыми кислотами. Они доставляют ДНК непосредственно в цитоплазму без деградации в лизосомах [133]. Так, при введении HVJ-липосомной плазмиды в почечную артерию экспрессия трансгена обнаруживается в клетках клубочка [127].

Другой методикой переноса является использование аденовирусного вектора. Почки длительно перфузируют *in vivo* или *ex vivo* аденовирусом с введенным геном. Интенсивная экспрессия трансгенного продукта отмечена в клетках клубочка, главным образом, в подоцитах [306].

Мезангиальные клетки также можно использовать как вектор для переноса генов. Мезангиальные клетки выделяют из изолированных клубочков, вводят *in vitro* необходимый ген и переносят в ткань почки путем введения в почечный кровоток. Так, введение гена, кодирующего ТФР- β , уменьшило пролиферацию клеток клубочка и продукцию провоспалительных цитокинов [146]. А введение мезангиального вектора, экспрессирующего ИЛ-10, привело к значительному снижению протеинурии при анти-ГМБ-нефрите у крыс.

Контроль трансгенной активности in vivo

Многие защитные молекулы продуцируются в ответ на локальное воспалительное окружение. При комбинации систем переноса генов с индуцируемыми промоторами возможно изменение свойств эндогенных защитных молекул уже в организме. Используя векторы в комбинации с

контролируемыми системами активации, можно создать обратимые системы «включения-отключения», контролирующие активность генов *in vivo* [144].

Другой проблемой, которая может возникнуть при лечении цитокинами, является большая молекулярная масса рекомбинантных белков. Следовательно, эти препараты нужно вводить инъекционно, что не очень удобно для пациентов, помимо этого, такие молекулы могут вызывать образование нейтрализующих антител, что ограничивает их эффективность и возможность длительного применения. Идентификация малых молекул, которые опосредуют эффекты этих цитокинов и подходят для фармакологического применения, вызывает наибольший интерес. Агонисты рецепторов и молекулы, участвующие в передаче сигнала, могут входить в подходящие для лечения препараты. Основной проблемой при этом является низкая специфичность молекул передачи сигнала, так как они участвуют в передаче сигнала от многих цитокинов. Например, эффективность различных противовоспалительных молекул, в том числе ИЛ-10, зависит от ингибции ядерного фактора-кВ (NF-кВ) – фактора, ответственного за транскрипцию генов воспалительных медиаторов. Перенос *in vivo* олигодезоксинуклеотидов с высоким сродством к NF-кВ воспроизводит эффективность противовоспалительных медиаторов [135].

1.5 Заключение

В последние десятилетия активно изучаются механизмы избирательной проницаемости гломерулярного фильтра для различных белков плазмы. Важное значение в этих процессах придают подоцитам и подоцит-ассоциированным молекулам щелевой диафрагмы. Выполняя важную роль в поддержании структуры и функции почечного клубочка в норме, подоциты имеют первостепенное значение при повреждении клубочка и прогрессировании почечного заболевания. Своеобразной «платформой» передачи сигналов, необходимых для поддержания функций подоцитов (правильной организации цитоскелета, поляризации, эндоцитоза, дифференцировки, ограничения

пролиферации и жизнеспособности клетки в целом), служит межподоцитарная щелевая диафрагма.

В настоящее время установлено, что изменение структуры и функции подоцита (подоцитопатия), ранее считавшееся специфическим признаком болезни минимальных изменений, встречается при различных нефропатиях: гломерулонефрите, гипертонии, диабетической нефропатии, а также при всех формах нефротического синдрома (врожденного и приобретенного). Изменение экспрессии белков щелевой диафрагмы при всех протеинурических нефропатиях является стереотипной реакцией подоцита на повреждение, поэтому уровень экскреции нефрина с мочой можно рассматривать в качестве маркера активного повреждения межподоцитарной щелевой диафрагмы и выраженности подоцитурии.

В эксперименте установлено, что повреждение эпителиальной клетки – подоцита в клубочках сопровождается не только попаданием в мочу структурных белков с развитием нефринурии, но и отслойку подоцитов от базальной мембраны клубочка со слущиванием их в мочу – подоцитурией.

Интенсивная отслойка подоцитов от БМК и потеря их с мочой приводят к развитию подоцитопении, что сопровождается «оголением» отдельных участков БМК, потерей формы капиллярных петель с образованием локальных выпячиваний базальной мембраны. При контакте этих «выбуханий» с париетальными клетками клубочка формируются синехии между капиллярными петлями и Боуеновой капсулой клубочка, что является пусковым механизмом для начала склерозирования клубочков.

Другим аспектом повреждения подоцитов и прогрессирования хронического гломерулонефрита является баланс между внешними повреждающими и эндогенными защитными факторами. Многочисленные исследования последних лет были сосредоточены в основном на повреждающих механизмах развития заболеваний почек (механизмы формирования клеточного инфильтрата, продукция воспалительных медиаторов – цитокинов, хемокинов,

адгезивных молекул, активация резидентных клеток, механизмы развития тубуло-интерстициального фиброза). Однако в ткани почки существует многоуровневая защитная система, которая регулирует воспалительный процесс и его своевременное завершение. Действие многих, а может быть, и всех воспалительных медиаторов регулируется ингибиторами или другими цитокинами, при этом количество и взаимодействие противовоспалительных молекул подчинено хорошо упорядоченной программе. Выработка противовоспалительных цитокинов и самоограничение воспаления является запрограммированным процессом, так как синтез противовоспалительных факторов, как, например, в случае ИЛ-10, запускается теми же провоспалительными стимулами. Для системы самозащиты в почке характерно многократное усиление сигнала за счет формирования каскадов защитных молекул: один медиатор защиты запускает экспрессию других или объединяется с другими противовоспалительными молекулами, формируя «защитные каскады» или даже «защитные сети», способствуя эффективному торможению дальнейшего распространения воспалительного процесса. Например, ИЛ-10 может повышать экспрессию нескольких протективных ИЛ-1 α и рецептора к ФНО- α . Важным источником противовоспалительных факторов, ограничивающих дальнейшее распространение воспаления, является воспалительный инфильтрат. Определенные клетки воспалительного инфильтрата - регуляторные Т лимфоциты, «альтернативные» макрофаги, дендритические клетки секретируют противовоспалительные и трофические факторы, участвуют в фагоцитозе клеток. Таким образом, в воспалительном инфильтрате существуют клетки, ответственные за подавление воспаления. «Альтернативные» макрофаги клеточного инфильтрата являются основным источником антагониста рецептора интерлейкина-1 (ИЛ-1 α), который конкурентно связывается с рецептором провоспалительного цитокина ИЛ-1 и предотвращает его эффекты. Такой же механизм относится и к ФНО- α , который подавляется растворимым рецептором к ФНО- α . Противовоспалительный цитокин – ИЛ-10, продуцируемый

регуляторными клетками инфильтрата, может играть важную роль в самоограничении воспаления.

Многие типы клеток способны экспрессировать цитокины, но одной из главных систем, управляющей их экспрессией, является система CD4⁺ Т хелперных клеток. Поэтому «противовоспалительный статус» ткани почки при иммуно-опосредованном заболевании определяется преобладающим типом иммунного ответа. Активация Th2 хелперных клеток или регуляторных Т лимфоцитов оказывает протективный противовоспалительный эффект путем непосредственного супрессивного действия на эффекторные и цитотоксические Т лимфоциты, но главным образом - за счет продукции противовоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-10.

Белки теплового шока, которые попадают во внеклеточное пространство или экспрессируются на поверхности клеток, играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза в норме, а также в подавлении хронического воспаления при аутоиммунных заболеваниях с помощью активации противовоспалительного фенотипа Т клеток, продуцирующих ИЛ-10.

Несостоятельность эндогенных механизмов защиты почки влечет за собой чрезмерную активацию эффекторного, повреждающего звена воспаления, и приводит к персистированию и хронизации болезни. Во многих экспериментальных моделях нефрита и при ХГН у человека показано, что хронические прогрессирующие заболевания почек характеризуются дисбалансом между про- и противовоспалительными факторами. Для оценки локальных механизмов самозащиты ткани почки имеет значение не только определение абсолютного количества противовоспалительных факторов в моче и ткани почки, но и расчет отношения факторов воспаления и защиты. Дефицит некоторых факторов тканевой самозащиты может определяться существованием генного полиморфизма и индивидуальными различиями в секреции их иммунными клетками. Так, например, при носительстве определенных аллелей генов ИЛ-1 α и

ИЛ-10 низкая степень экспрессии защитных медиаторов при воспалении предрасполагает к развитию тяжелых прогрессирующих форм заболеваний почек.

Поиск ключевых протективных медиаторов и их возможных сочетаний, способных модулировать воспаление в почке и «переключать» течение процесса в сторону разрешения и выздоровления, представляет собой важный аспект для разработки эффективного лечения. Усиление эндогенных протективных механизмов путем введения противовоспалительных факторов может лежать в основе новой стратегии терапевтического вмешательства. Применение протективных факторов при экспериментальных заболеваниях привело к хорошему эффекту, предпринимаются попытки лечения некоторыми противовоспалительными молекулами (рекомбинантными ИЛ1-ра, ИЛ-10, белками теплового шока) иммуно-опосредованных заболеваний человека. Однако для их широкого клинического применения при ХГН необходимы дальнейшие исследования.

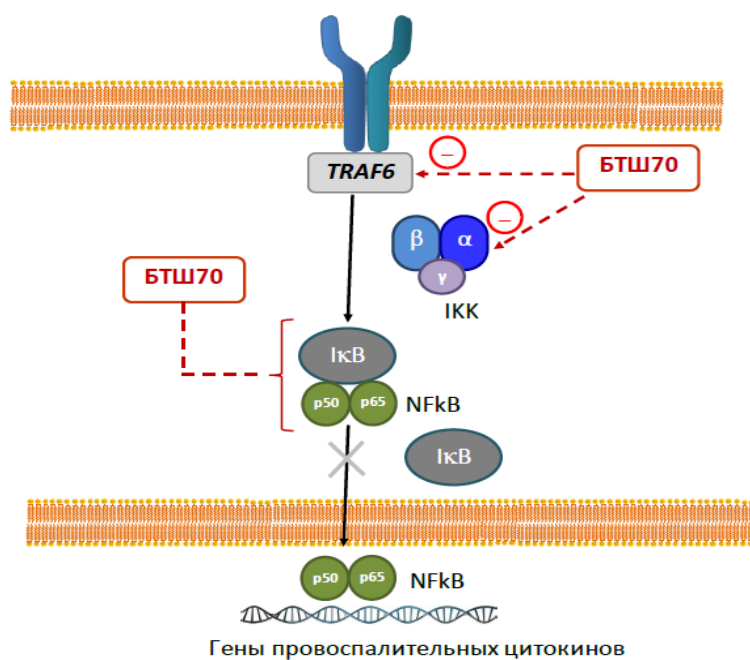


Рисунок 1. Роль БТШ-70 в активации NF-kB.

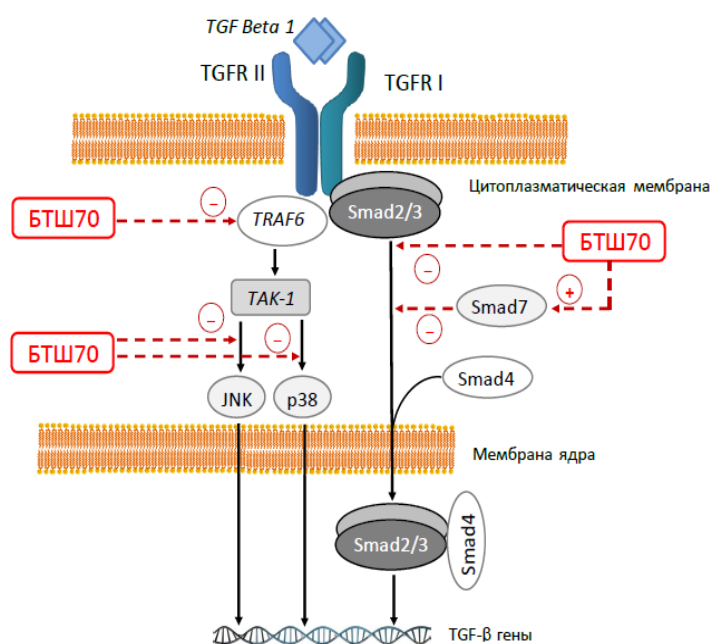


Рисунок 2. Роль БТШ70 в передаче сигнала трансформирующего фактора роста-β

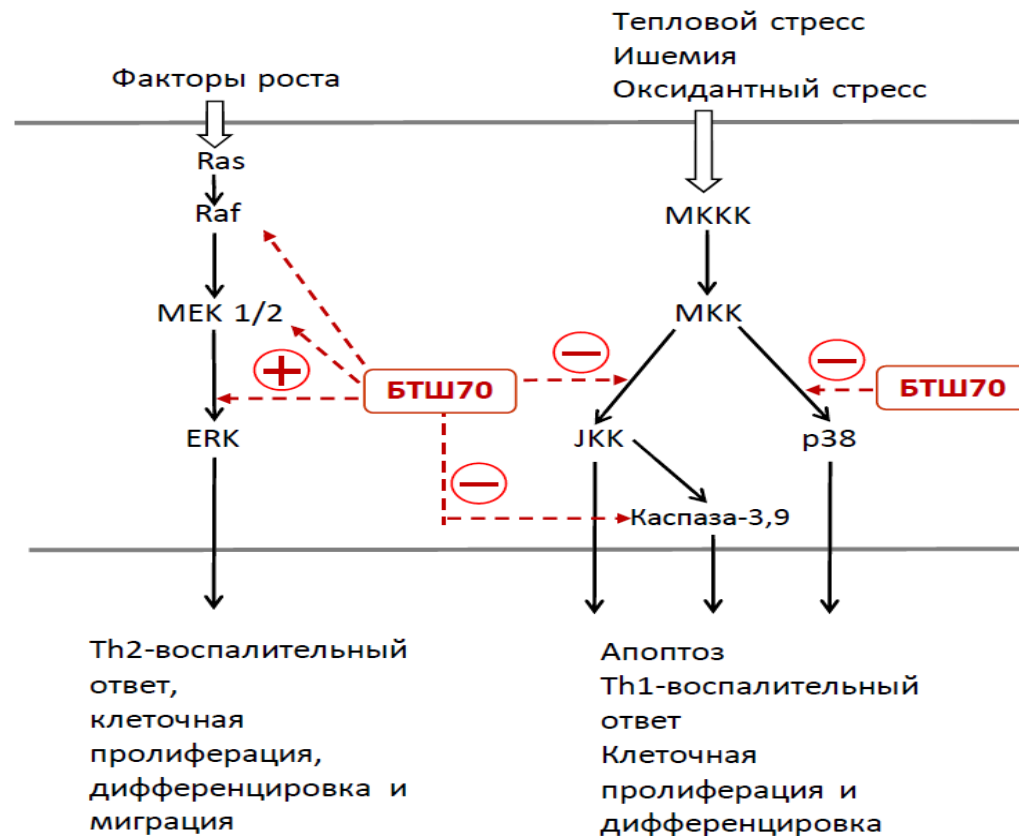


Рисунок 3. Роль БТШ-70 в передаче сигнала через систему стресс-киназ

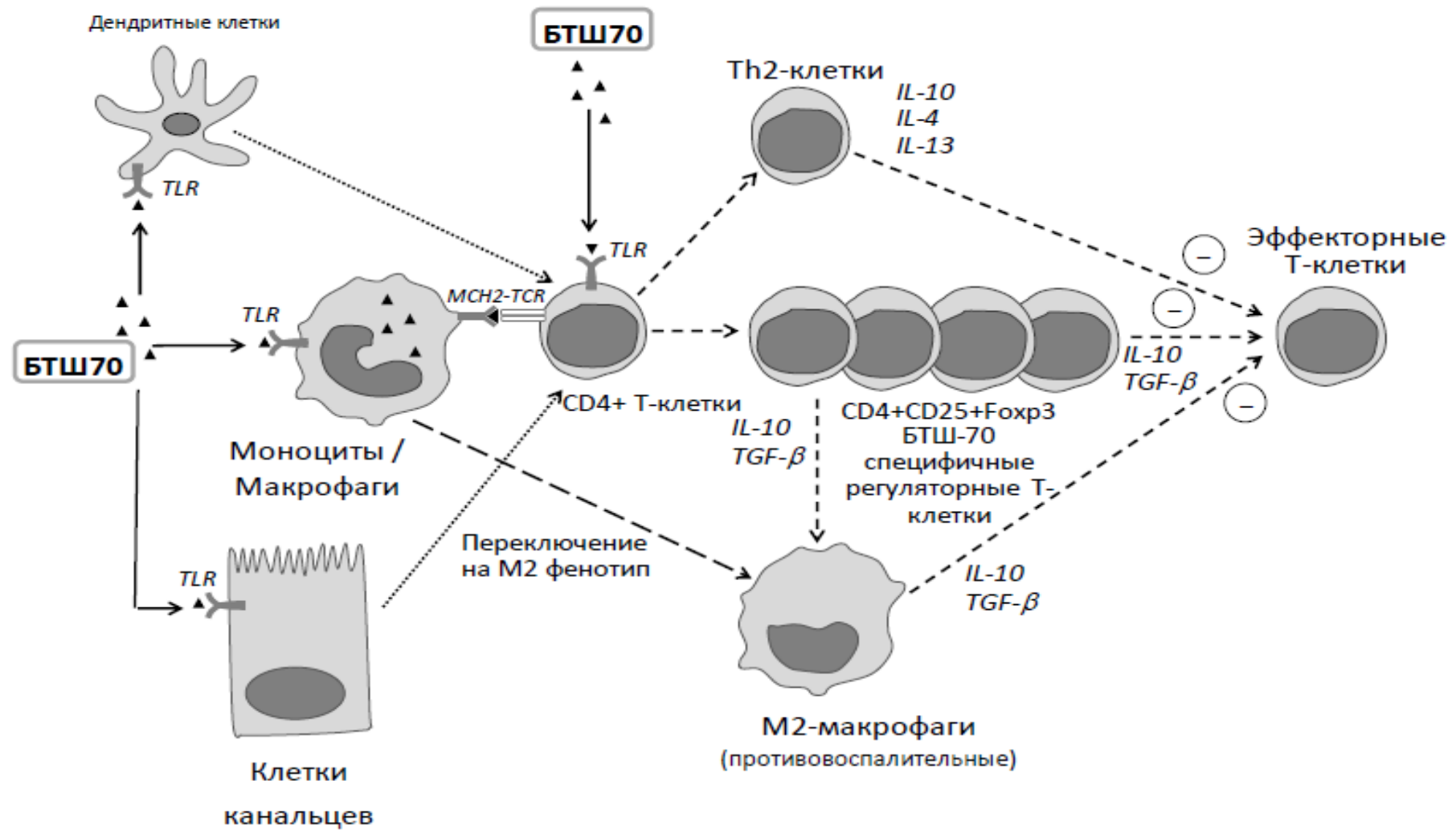


Рисунок 4. Роль БТШ-70 в противовоспалительном ответе

Глава 2

Материалы и методы исследования

2.1 Характеристика обследованных больных

В исследование включено 159 больных ХГН, клинически протекающего преимущественно с протеинурией и нефротическим синдромом (протеинурические формы ХГН): 73 женщины (45,9%) и 86 мужчин (54,1%) в возрасте от 16 до 74 лет (в среднем 35,0 [25-50] лет), наблюдавшихся в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева, Университетской клинической больнице №3 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) с 2009 по 2016 годы.

У 105 пациентов (66%) с ХГН диагноз был подтвержден морфологически. У 53 больных обнаружена морфологическая картина, характерная для истинных протеинурических форм хронического гломерулонефита (истинных подоцитопатий): у 21 – мембранозная нефропатия (МН), у 4 – нефрит с минимальными изменениями (МИ), у 9 – фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС); у 19 – мезангиокапиллярный ГН-мембранопролиферативный (МКГН- МПГН). У 41 больного выявлен мезангиопролиферативный ГН (МезПГН) и у 11 – нефросклероз. Определение морфологической формы нефрита с помощью световой микроскопии, иммуногистохимического исследования ткани почки и электрономикроскопического исследования почечных биоптатов выполнялись в рамках стандартного обследования пациентов с ХГН на кафедре патологической анатомии д.м.н. профессором В.А. Варшавским.

Все пациенты по степени активности ХГН и уровню протеинурии были разделены на 3 группы.

Группу I (с мочевым синдромом - МС) составили 57 пациентов с протеинурией от 1 до 3 г/сут без формирования нефротического синдрома: 41 больной, у которых МС развился в дебюте и персистировал в среднем в течение последующих 4 [2;7] месяцев до исследования, у 16 больных после дебюта заболевания с НС заболевание в дальнейшем протекало с МС. Клинически больные I группы характеризовались протеинурией (ПУ) субнефротического уровня (в среднем 1,9 [1,4;3,2] г/сут) без биохимических признаков нефротического синдрома; у 33 из 57 больных ПУ сочеталась с малой или умеренной эритроцитурией (в среднем 6 [3;25] в п.зр.). Артериальная гипертензия (систолическое артериальное давление от 150 до 190 мм рт. ст., диастолическое артериальное давление от 100 до 110 мм рт. ст.) выявлялась у 15 больных. Уровень креатинина в среднем по группе составил 1,06 [0,8;1,5] мг/дл, скорость клубочковой фильтрации - 90 [60;117] мл/мин.

В группу II (с нефротическим синдромом – НС) включен 71 больной. У больных этой группы наблюдалась различная выраженность НС (ПУ от 3,2 до 22 г/сут, альбумин сыворотки крови от 31,8 г/л до 16,8 г/л), у 24 больных отмечался тяжелый нефротический синдром с отеками до степени анасарки, наличием полостных отеков, ПУ составляла 10,0 [7,3;16,0] г/сут, альбумин менее 20 г/л, у 47 пациентов НС был умеренным (ПУ-5,54 [3,4;7,9] г/сут).

У 25 больных НС протекал с нарушением функции почек (повышение креатинина сыворотки крови от 1,27 мг/дл до 3,28 мг/дл (1,94 [1,4;2,42] мг/дл, снижение СКФ 42 [30;50] мл/мин), у 13 из них с наиболее активным течением НС сочетался с остонефритическим синдромом (ОНС) (эритроцитурия от 20 до 100 в п.зр., систолическое артериальное давление от 150 до 200 мм рт. ст, диастолическое артериальное давление от 100 до 120 мм рт. ст., с нарушением функции почек (креатинин от 1,37 до 3,28 мг/дл, СКФ – от 26 до 56 мл/мин).

Группу III (ремиссия ХГН) составил 31 больной с ремиссией нефрита после успешной иммуносупрессивной терапии. У больных этой группы выявлялась небольшая ПУ 0,48 [0,157;0,78] г/сут, у 16 из них – изолированная, у 15 – в

сочетании с минимальной или умеренной эритроцитурией (в среднем 6 [1;20] в п.зр.). Артериальная гипертензия (систолическое артериальное давление от 140 до 170 мм рт. ст., диастолическое артериальное давление от 95мм рт. ст. до 100 мм рт. ст.) отмечалась у 10 больных. Функция почек у 20 больных была сохранна, у 11 отмечались признаки почечной дисфункции: СКФ (48 [36;66] мл/мин), креатинин сыворотки крови 1,7 [1,32; 2,26] мг/дл. Клиническая характеристика групп представлена в таб.1.

В группу контроля вошли 20 практически здоровых лиц (10 женщин и 10 мужчин) от 20 до 41 года (в среднем 31 [28 -37] лет) без протеинурии, нормальным артериальным давлением и сохранной функцией почек.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика обследованных больных ХГН

Группа Показатели	Группа I (МС) n=57	Группа II (НС в целом) n=71	умеренный НС n=47	Тяжелый НС n=24	III группа (ремиссия) n=31
Суточная ПУ, г/сут	1,9 [1,4;3,2]	6,12 [4,37;10,0]	5,54 [3,4;7,9]	10,0 [7,3;16,0]	0,48 [0,157;0,78]
Эритроцитурия, в п.зр.	6 [3;25]	8 [2;30]	5[2,11]	8[3;16]	6 [1;15]
Альбумин сыворотки, г/л	39,8 [37,5; 42,4]	25,6 [21,3; 30,7]	28,7 [25,0; 31,0]	19,0 [17,5; 20,0]	43,8 [41,2; 46,1]
Общий белок сыворотки, г/л	63,2 [59,7;68,7]	43,9 [39,2; 50,6]	46,9 [42,5; 51,6]	37,9 [33,6; 37,7]	67,8 [65,2; 71,9]
Креатинин сыворотки, мг/дл	1,1 [0,85; 1,65]	1,06 [0,8; 1,5]	1,0 [0,72; 1,4]	1,25 [0,9; 1,93]	1,03 [0,84; 1,5]
СКФ (по Ребергу), мл/мин	87,3 [55,0; 114,5]	90,0 [60,0; 117,0]	101,0 [76,0; 134,0]	65,3 [43,0; 98,8]	76,0 [55,0; 116,0]
САД, мм рт.ст.	130,0 [125,0; 140,0]	135,0 [120,0; 160,0]	140,0 [120,0; 160,0]	135,0 [130,0; 150,0]	120,0 [120,0; 135,0]
ДАД, мм рт.ст.	80,0 [80,0; 90,0]	90,0 [80,0; 100,0]	90,0 [80,0; 100,0]	82,5 [80,0; 90,0]	80,0 [80,0; 90,0]

2.2 Специальные методы исследования

2.2.1 Определение молекулярных факторов повреждения и «системы самозащиты почки» в моче с помощью ELISA

С помощью специальных методов исследования у больных ХГН были изучены Показатели, отражающие степень повреждения подоцитов:

- нефринурия (основной белок межподоцитарной щелевой диафрагмы, попадает в мочу в результате ее разрушения)
- подоцитурия (наличие подоцитов и их фрагментов в моче, результат отслоения и слущивания подоцитов от гломерулярной базальной мембраны)

Провоспалительные факторы:

- Моноцитарный хемотаксический протеин-1 (хемокин, участвующий в механизмах развития протеинурии, непосредственно воздействуя на эпителиальную клетку гломерулярной мембраны - подоцит)
- Интерлейкин-6 – цитокин, который синтезируется клетками воспалительного инфильтрата - мезангиальными, макрофагами, лимфоцитами, эндотелиальными клетками и подоцитами, обладает провоспалительными свойствами.

Факторы апоптоза подоцитов:

Каспаза-9 (относится к группе иницирующих апоптоз каспаз, которые запускают программу клеточной гибели)

Показатели, отражающие функционирование «системы самозащиты почки»:

Белки теплового шока-27 и 70

Факторы выживаемости подоцитов - Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF)

Противовоспалительные цитокины - интерлейкин -10 (основной противовоспалительный цитокин, который синтезируется Т-регуляторными клетками в очаге воспаления), антагонист рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1ra)(ограничивает действие ИЛ-1 в зоне воспаления, участвует в естественном разрешении воспалительного процесса)

Компоненты протеолитической системы - Матриксные металлопротеиназы -2 и -9 (участвуют в расщеплении компонентов экстрацеллюлярного матрикса и противодействуют избыточному накоплению фиброза)

10 мл утренней мочи центрифугировали при комнатной температуре 15 минут с частотой 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость помещали в пробирки типа Эппендорф 2мл и замораживали при температуре -20°C.

2.2.2 Определение подоцитов и их фрагментов в моче

Показатель подоцитурии (экскреции с мочой целых подоцитов или фрагментов) определяли с помощью метода проточной цитофлуометрии меченых подоцитов. Для этого 10 мл утренней мочи центрифугировали в течение 5 мин с частотой 2500 оборотов в минуту, и затем клеточный осадок промывали 3 раза путем добавления физиологического раствора (0,9% NaCl), перемешивания клеточной суспензии с раствором, центрифугирования и удаления надосадочной жидкости. 100мкл полученной отмытой клеточной суспензии (мочевосадка) инкубировали с 5 мкл антител к подокаликсину, меченых фикоэритрином, в течение 45 мин при 4 °C для выявления подоцитов в клеточной суспензии мочевого осадка. После заключительного этапа отмывания клеточной суспензии физиологическим раствором проводили цитофлуометрию меченых подокаликсином подоцитов и их фрагментов (BeckmanCoulter FC500, программаCellQuest, США).

Молекулярные медиаторы в моче и сыворотке больных ХГН и методы их определения представлены в таб. 2.

**Методы определения молекулярных медиаторов в моче и сыворотке крови
больных ХГН**

Изученные показатели	Метод определения, наборы реактивов для исследования	Количество больных
Нефринурия (моча)	ELISA (Uscnc Life Science Inc. Wuhan, Kit for human nephrin», China)	74
Подоциты (подоцитурия) (моча)	Метод проточной цитофлуометрии, (мышинные антитела к подокаликсину, Abcam, Великобритания)	33
МСР-1 (моча)	ELISA (BioSource International, Immunoassay Kit, США, Бельгия)	63
ИЛ-1 α (моча)	ELISA (BenderMedsystems, Австрия)	80
VEGF-A (моча)	ELISA (BenderMedsystems, Австрия)	80
Каспаза-9 (моча)	ELISA (BenderMedsystems, Австрия)	78
БТШ-70 (моча)	ELISA (Enzo, США)	84
Антитела к БТШ70 (сыворотка)	ELISA (Enzo, США)	84
БТШ-27 (моча)	ELISA (Enzo, США)	84
ИЛ-6 (моча)	ELISA (Invitrogen, США)	84
ИЛ-10 (моча)	ELISA (eBioscience, Австрия)	84
Металлопротеиназы -2 и-9 (моча)	ELISA (R&D Systems Quantikine, США)	77
ТИМП-2	ELISA (R&D Systems Quantikine, США)	77

2.2.3 Определение антител к БТШ-70 в сыворотке крови с помощью ELISA

Уровень антител к БТШ-70 определялся в сыворотке крови больных. Антитела к БТШ-70 исследовали в сыворотке крови у 82 больных ХГН иммуноферментным методом (набор для определения антител к БТШ70 «Enzo», США). 10 мл крови центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Сыворотку крови замораживали в пробирках типа Эппендорф 2мл и хранили в рефрижераторе при температуре -20°C.

Определение всего спектра медиаторов в моче и сыворотке больных ХГН было проведено на базе межклинической иммунологической лаборатории ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

У 85 больных ХГН образцы мочи и крови брали до начала лечения иммуносупрессивными препаратами, у 74 пациентов – на фоне продолжения начатой ранее терапии преднизолоном и/или цитостатиками. При проведении иммуносупрессивной терапии оценивали наличие/отсутствие ответа и сроки достижения ремиссии заболевания. Ответом на проводимую иммуносупрессивную терапию считали уменьшение протеинурии менее 0,3г/сут. со стабильной функцией почек или уменьшение протеинурии на 50% и более от исходной (с нормализацией белков сыворотки крови – купирование нефротического синдрома) при условии улучшения или сохранения стабильной функции почек. Для оценки прогностического значения исследованных тестов у больных ХГН было проанализировано течение заболевания и ответ на иммуносупрессивную терапию в зависимости от исходной величины нефринурии - у 23 пациентов, подоцитурии - у 32 пациентов, уровня антител к БТШ-70 в сыворотке крови- у 37 пациентов.

2.2.4 Определение экспрессии факторов «системы самозащиты» с помощью иммуногистохимического метода в ткани почки

В ткани почки больных ХГН были изучены (таб. 3):

- количество подоцитов по экспрессии ядерного маркера - опухоли Вильмса (WT-1)
- белок теплового шока -70
- количество Трег клеток в воспалительном инфильтрате (по экспрессии ядерного транскрипционного фактора FoxP3) (таб. 3).

Иммуногистохимическое исследование биоптатов почек проведено 39 больным ХГН. Оценена экспрессия БТШ-70 и FoxP3 –ядерного фактора регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25+), секретирующих противовоспалительный ИЛ-10, а также степень подоцитопении по количеству окрашенных WT-1 ядер подоцитов.

Для иммуногистохимического исследования ткани почки использованы следующие наборы: поликлональные антитела кролика к БТШ70 «SpringBioscience», США, в разведении 1:800, поликлональные антитела кролика к FoxP3 «SpringBioscience», США, в разведении 1:200, антитела моноклональные мышинные к протеину опухоли Вильмса 1 (WT1), клон 6F-H2, DАСО, готовые антитела) 30 мин при комнатной температуре. Для получения окраски использовали систему визуализации - EnVision («DAKO», Дания).

Результаты иммуногистохимического окрашивания оценивали и выражали полуколичественно: экспрессия отсутствует(-); очаговая экспрессия слабой интенсивности (+), множественные очаги экспрессии умеренной интенсивности (++) , множественные очаги экспрессии выраженной интенсивности (+++).

С помощью *морфометрического* метода было оценено число противовоспалительных Т-рег клеток в ткани почки по экспрессии Fox-P3 позитивных ядер в воспалительных интерстициальных инфильтратах (в корковом слое на участке 1,5 мм²).

Таблица 3

Показатели в ткани почки больных ХГН

Изученные медиаторы	Метод определения, наборы реактивов для исследования	Количество больных
WT-1 (количество подоцитов в клубочке)	антитела моноклональные мышинные к протеину опухоли Вильмса 1 (WT1), клон 6F-H2, ДАКО, Дания	40
БТШ-70	поликлональные антитела кролика к БТШ70, SpringBioscience, США	39
FoxP3 (количество Т-рег клеток в воспалительных инфильтратах)	поликлональные антитела кролика к FoxP3, SpringBioscience, США	39

Степень подоцитопении оценивали по среднему числу WT-1 -позитивных ядер клубочка на 1 срез, изучали 4-5 последовательных срезов, подсчет ядер проводили в нескольких клубочках, определяли средние значения показателя в биоптате почки пациента. В качестве контроля были использованы образцы ткани почек (n=20), удаленных в связи с урологическими причинами, при исследовании которых не было выявлено гломерулярной патологии.

2.3 Методы оценки антипротеинурического действия препарата, блокирующего эффекты МСР-1, у больных ХГН

В исследование включено 7 больных хроническим гломерулонефритом (1 женщина и 6 мужчин в возрасте 31 [24; 57] года) с активным течением ХГН: с персистирующей протеинурией более 1г/сут, у которых возможно было отсрочить патогенетическое лечение кортикостероидами и цитостатиками на 3

месяца без высокой вероятности ухудшения. Каждый пациент подписывал информированное согласие на участие в исследовании.

Морфологически диагноз был подтвержден у 6 больных: у 4 больных были отмечены морфологические варианты протеинурического гломерулонефрита: мезангиокапиллярный ГН-1, мембранозная нефропатия -1, минимальные изменения -1, фокальный сегментарный гломерулосклероз-1. У 2 выявлен мезангиопролиферативный ГН.

У 4-х больных с выраженным мочевым синдромом уровень суточной ПУ в среднем составлял 2,03 [1,48; 3,92] г/сут, у одного больного ПУ сочеталась с выраженной эритроцитурией (до 100 в п/зр.), у 3-х – с умеренной эритроцитурией (до 20 в п/зр.). У 3-х больных отмечалось начальное снижение функции почек (креатинин в среднем 1,27 [1,17; 1,54] мг/дл, СКФ 62-74 мл/мин). У 2 - умеренная артериальная гипертензия (АД до 160/100 мм рт.ст.).

У 3 больных отмечался умеренный нефротический синдром (НС): протеинурия составляла в среднем 2,5 [2,46; 5,28] г/сут, альбумин 29 [27,6; 30] г/л, у двух больных НС сочетался с умеренной эритроцитурией до 20 в п/зр. Функция почек у этих больных была сохранна: креатинин 0,68 [0,64; 0,72] мг/дл, СКФрасч. по СКD-EPI 100-140 мл/мин) У всех больных отмечалась умеренная артериальная гипертензия (АД до 150/100 мм рт.ст.).

Клиническая характеристика обследованных больных дана в таб. 4.

В ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ разработан препарат, представляющий собой пептид X молекулы МСР-1(65-76 МСР-1). **Пептид X МСР-1 (65-76)** представляет собой последовательность аминокислот Н-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-ОН. Показано, что блокирующий механизм действия пептида МСР-1 (65-76) обусловлен связыванием гликозаминогликанов на поверхности клеток и конкурентным вытеснением эндогенного МСР-1 и, возможно, других хемокинов, благодаря чему осуществляется противовоспалительное действие и протективное влияние на подоциты.

Исследование было одобрено МЗРФ разрешением N720 от 16.02.2012г, Советом по этике при Министерстве здравоохранения и социального развития России N 34 от 08.02.2012г., Межвузовским комитетом по этике, протокол N02-12 от 16.02.2012г.

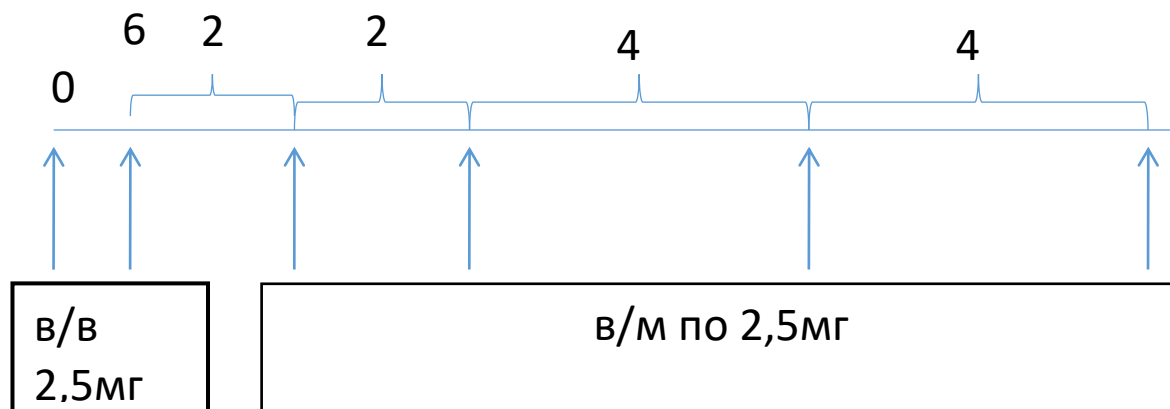
Таблица 4

**Клиническая характеристика больных, леченых препаратом,
блокирующим МСР-1**

	МС (n=4)	НС (n=3)	Достоверность различий, р
Возраст, годы	38,5 [27;55]	24 [21;57]	0,38
Пол	3м/1ж	3м	-
Протеинурия, г/сут	3,07 [2,02; 4,12]	2,91 [1; 5,28]	0,72
Эритроцитурия	У 3 умеренная; У 1 выраженная	У 2 умеренная; у 1 выраженная	-
Общий белок сыворотки крови, г/л	64,2 [61,3; 67,6]	48,7 [44,4;56,3]	0,03
Альбумин сыворотки крови, г/л	40,8 [38,9; 43,7]	29 [27,6; 37,2]	0,07
Креатинин сыворотки крови, мг/дл	1,27 [0,94; 1,54]	0,72 [0,64; 1,14]	0,15
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	140 [125;160]	130 [130;150]	0,72
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	95 [80;100]	80[80;90]	0,37
Длительность нефрита, годы	4 [3;17,5]	0,5 [0,5; 5]	0,2
МСР-1 в моче, пг/мл	101,4 [77,2; 195,3]	102 [62;582]	0,72

Препарат вводили больным ХГН по следующей схеме: в первую неделю лечения - 6 инъекций по 2,5мг с интервалами 6 часов между двумя первыми, 24 часа между последующими двумя, 48 часов между пятой и шестой инъекциями. Первые 2 инъекции выполнялись внутривенно, остальные 4 – внутримышечно (суммарная доза – 15мг) (рис. 5). В выборе интервалов и кратности между введениями препарата в первую неделю лечения ориентировались на схему, использованную у пациентов при стентировании коронарных сосудов с целью

подавления острого воспаления. У 6-ти больных через четыре недели курс лечения повторяли. Всего проведено 3 полных курса введения препарата. У одного больного в связи с нарастанием тяжести НС проведен однократный курс лечения препаратом, на 21 сутки была начата стандартная иммуносупрессивная терапия глюкокортикостероидами и циклофосфамидом.



в/в – препарат вводился внутривенно

в/м – препарат вводился внутримышечно

Рисунок 5. Схема введения пептида МСР-1 (65-76)

Всем пациентам проводилась нефропротективная и антигипертензивная терапия ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента (и-АПФ) или блокаторами рецепторов ангиотензина (БРА), антагонистами кальциевых каналов, бета-блокаторами, альфа-адреноблокаторами, а также гиполипидемическая терапия (статины – симвастатин, аторвастатин).

Исследование мочевой экскреции МСР-1 и TGF- β проводили методом ELISA (МСР-1 Bioscience, Austria), Динамику суточной протеинурии и цитокинов (МСР-1 и TGF- β) в моче в течение первого курса лечения оценивали 1 раз в 7 дней сравнивали с результатами исследования ИЛ-8 и ИЛ-10 в сыворотке крови методом проточной флуометрии (метод Immulite). При повторных курсах введения Инграмона показатели протеинурии, МСР-1, TGF- β , ИЛ-10, ИЛ-8 исследовали перед введением препарата (1 раз в месяц).

2.4 Методы статистической обработки

Анализ полученных результатов проводили с использованием методов вариационной статистики с помощью программных пакетов STATISTICA 6,0 и SPSS 23. Для описания клинико-лабораторных данных, а также показателей подоцитарной дисфункции и «системы самозащиты почки» рассчитывались медиана и интерквартильный размах, включающий 25-й и 75-й процентиля. Применены 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. Для выявления и оценки связей между исследуемыми показателями - непараметрический метод ранговой корреляции Спирмена, а также метод Каплан-Майер. Для оценки информативности изученных показателей проведен ROC-анализ и рассчитана площадь под кривой (AUC) для каждого показателя. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

Результаты исследования

3.1 Показатели подоцитарного повреждения у больных ХГН

3.1.1 Экскреция нефрина с мочой больных ХГН

Уровень нефринурии в группах больных активными протеинурическими формами ХГН (I, II гр.) был выше, чем у больных с ремиссией заболевания (III гр.) и у здоровых, а у больных с НС (II гр.) значимо выше, чем у больных с субнефротическим уровнем ПУ (I гр.). Наиболее высокий уровень нефринурии отмечался у пациентов с тяжелым нефротическим синдромом («большой» протеинурией более 10 г/сут, снижением уровня альбумина сыворотки менее 20 г/л) (таб. 5).

Таблица 5

Показатель нефринурии у больных хроническим гломерулонефритом

Группы обследованных	n	Нефринурия, (нг/мл)
Здоровые	10	7,9 [1,7; 9,5]
ХГН I группа (с выраженным МС)	18	9,5 [7,6; 13]*
ХГН II группа (НС)	38	16,9 [10,9; 27,8] **
Умеренный НС	28	16,6 [10,45; 27,3]
Тяжелый НС	10	17,8 [16,1; 37,5]
ХГН III группа (ремиссия)	18	7,25 [5,4; 9,8]

* - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми и группой I, ** $p < 0,01$ по сравнению с группами I, II

Между показателем нефринурии и величиной суточной ПУ у больных ХГН I и II групп ($R_s = 0,27$, $p < 0,05$) установлена корреляция со слабой силой связи (рис. 6).

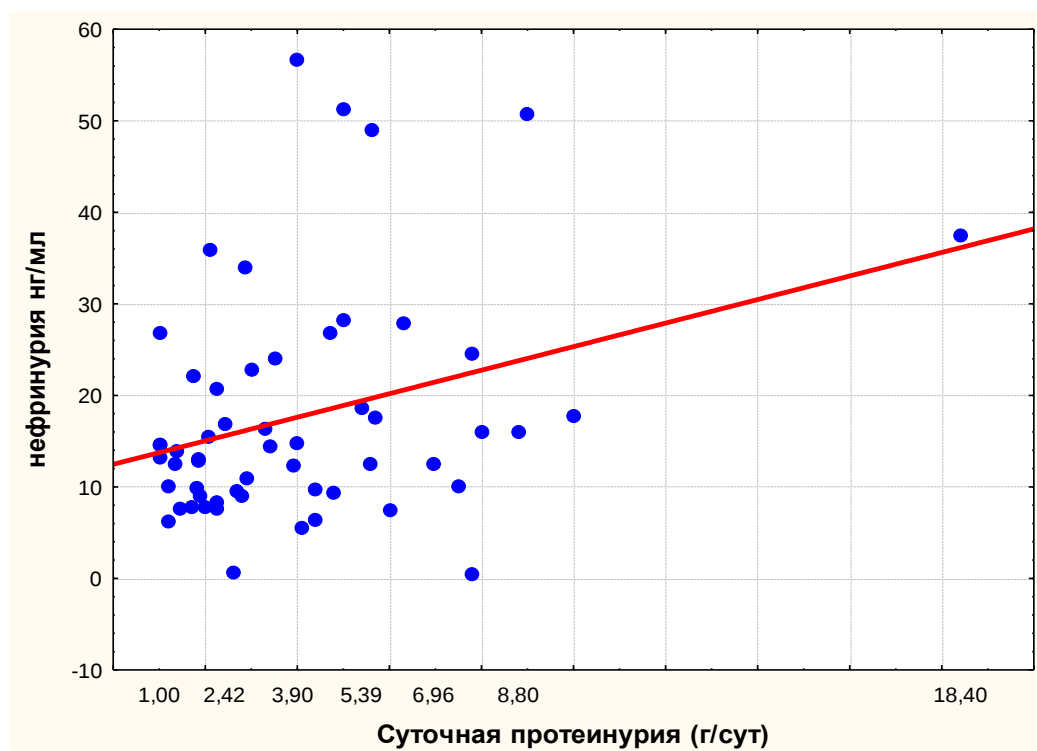


Рисунок 6. Корреляция между протеинурией и нефринурией.

Учитывая важную роль межподоцитарной щелевой диафрагмы в механизмах гломерулярной проницаемости, экскреция нефрина с мочой более детально проанализирована у больных II гр. с НС - с клинически наиболее выраженным проявлением повреждения гломерулярного фильтра.

Для определения значения величины нефринурии как показателя степени подоцитарной дисфункции и критерия активности/прогрессирования ХГН был выбран дискриминационный уровень (17 нг/мл), превышающий показатель медианы среди всех больных ХГН (рис. 7). Группы больных ХГН с показателями НУ выше и ниже этого уровня достоверно не различались по выраженности нефротического синдрома (таб. 6).

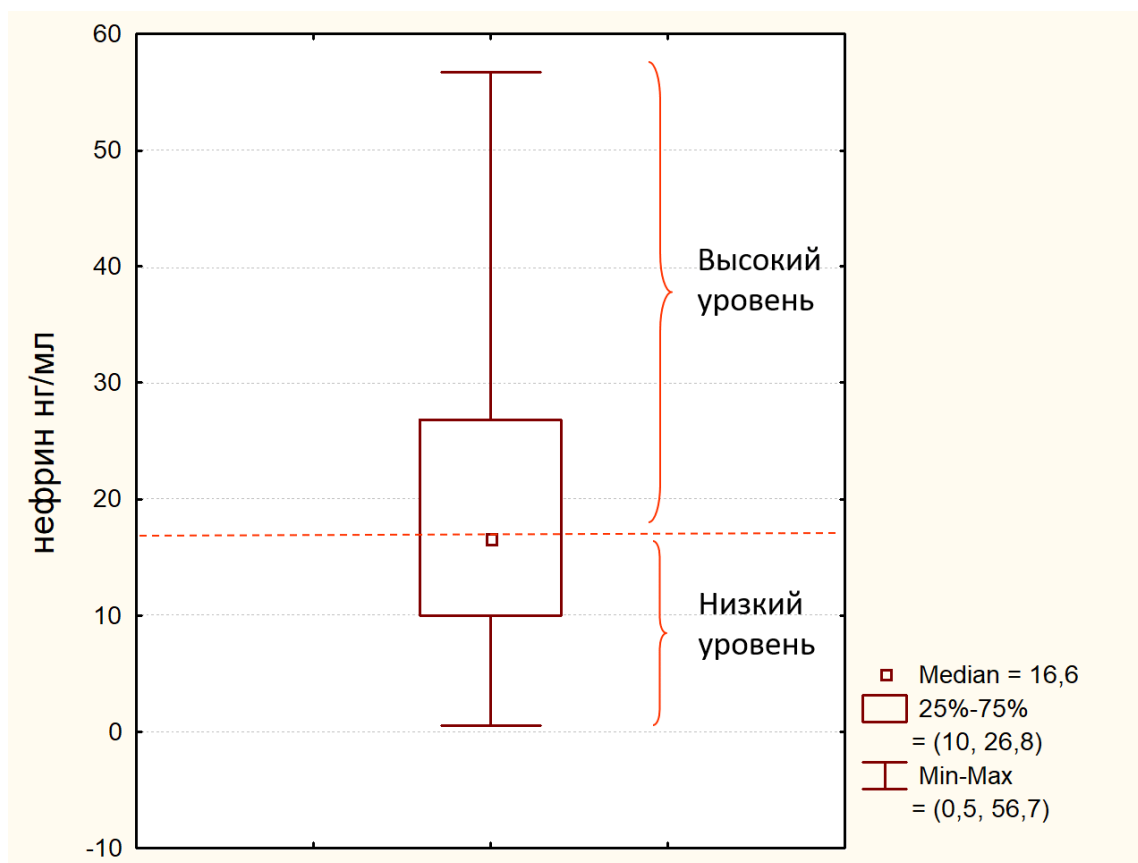


Рисунок 7. Распределение показателя нефринурии у больных ХГН с НС (медиана 17нг/мл) (n=74)

У 19 из 38 (50%) больных с НС отмечались высокие значения экскреции нефрина - более 17 нг/мл (высокий уровень), у другой половины больных уровень нефринурии был менее 17нг/мл (низкий уровень). Среди пациентов с высокой нефринурией в 3 раза чаще, чем с низкой отмечалось прогрессирующее течение нефрита, в том числе у 7 из 19 в сочетании с артериальной гипертензией и нарушением функции почек, включая остронефритический синдром. Кроме того, у этих больных предшествующий период существования НС был более длительным (в среднем около 9 мес. против 5 мес. у пациентов с низкими показателями нефринурии, $p < 0,01$) (рис. 8). Полученные данные свидетельствуют о том, что повреждение подоцитов было более тяжелым при пролонгированном повреждении - у больных с длительно персистирующим нефротическим синдромом.

Таблица 6

Клинико-лабораторная характеристика больных ХГН Пгр. (с НС) в зависимости от показателя нефринурии (n=38)

Показатели	Нефринурия <17нг/мл n= 19	Нефринурия ≥17нг/мл n= 19	достоверность различий
Суточная протеинурия, г/сут	4,24 [3,1; 6,48]	5,0 [2,86; 6,3]	p=0,71
Альбумин сыворотки, г/дл	2,71 [2,3; 3,49]	3,1 [2,1; 3,3]	p=0,96
Общ. белок сыворотки, г/дл	4,97[4,2; 5,7]	5,1 [4; 5,5]	p=0,83
Количество больных с ОНС, %	2 из 19 (10,5%)	7 из 19 (36,8%)	p=0,06
Длительность НС, мес.	5 [1;8,5]	9 [6;17]	<0,0018

Различия между двумя группами оценивались с помощью критерия Манна-Уитни, по частоте биномиального признака – критерия Фишера

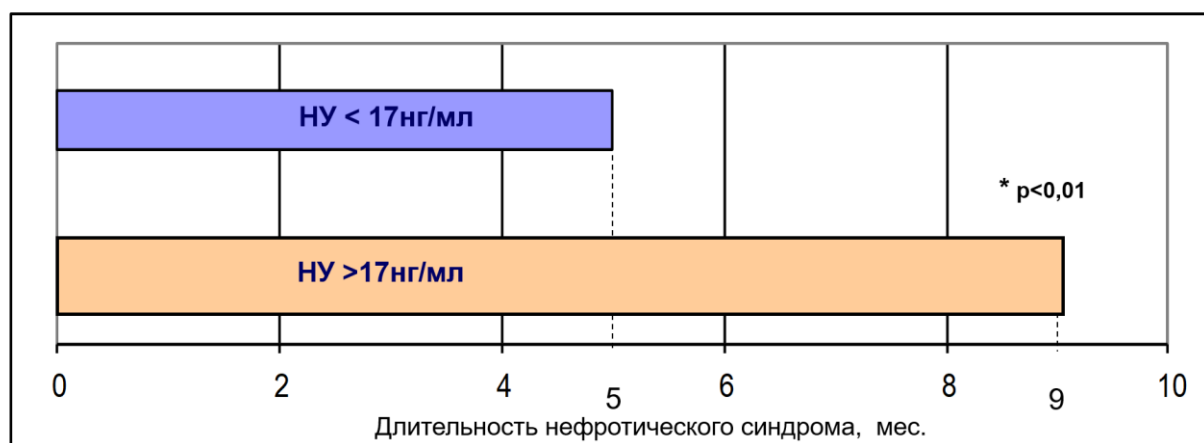


Рисунок 8. Длительность нефротического синдрома у больных ХГН (n=38) с разным уровнем нефринурии

Мы оценили экскрецию нефрина с мочой в зависимости от наличия и распространенности склеротических изменений в клубочках почек, рассчитанных по проценту склерозированных клубочков. Так, не отмечено достоверной корреляции между уровнем нефрина в моче и процентом склерозированных

клубочков ($R_s = -0,32$, $p = 0,13$). Повышенные значения нефринурии у больных с высоким процентом склерозированных клубочков в биоптате (более 50%), по-видимому, отражают продолжающееся повреждение сохранившихся подоцитов и гломерулярного фильтра (что также находит подтверждение в сохранении высокой протеинурии) (рис. 9)

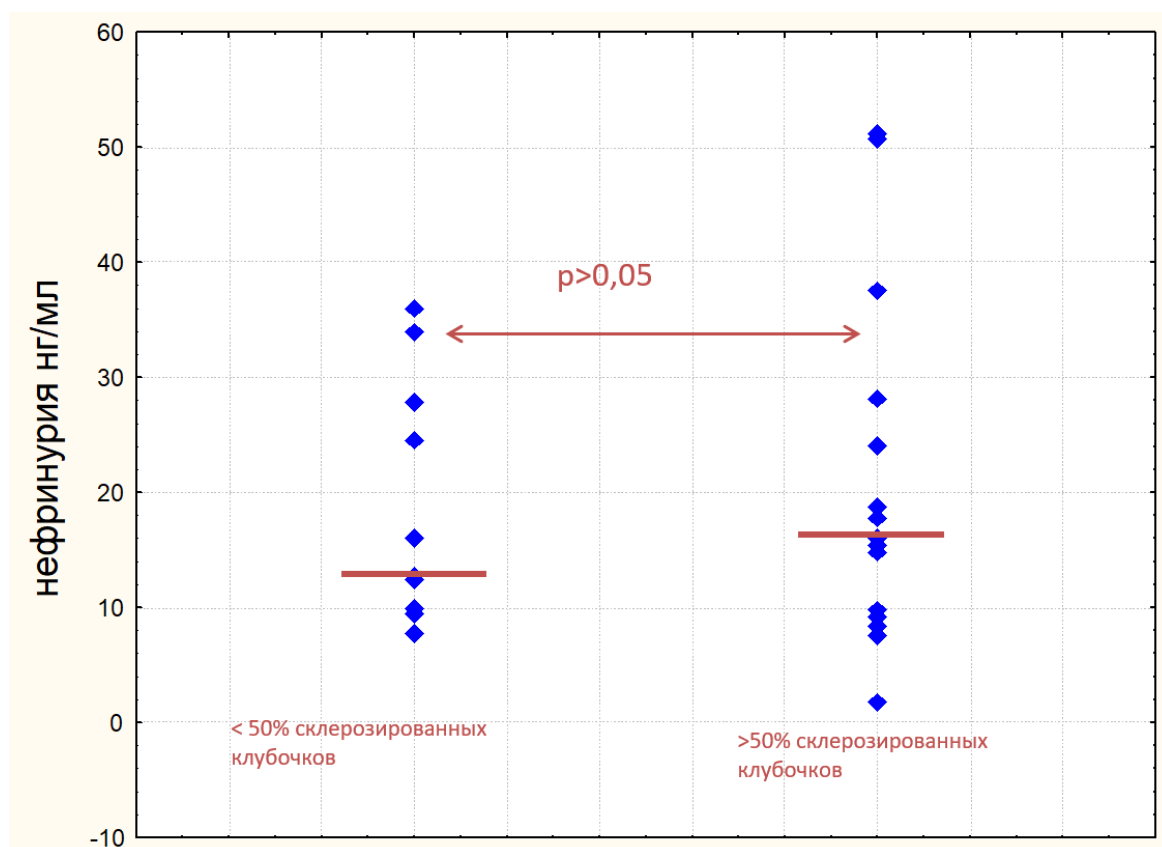


Рисунок 9. Нефринурия у больных активными протеинурическими формами ХГН в зависимости от выраженности гломерулосклероза (n=33)

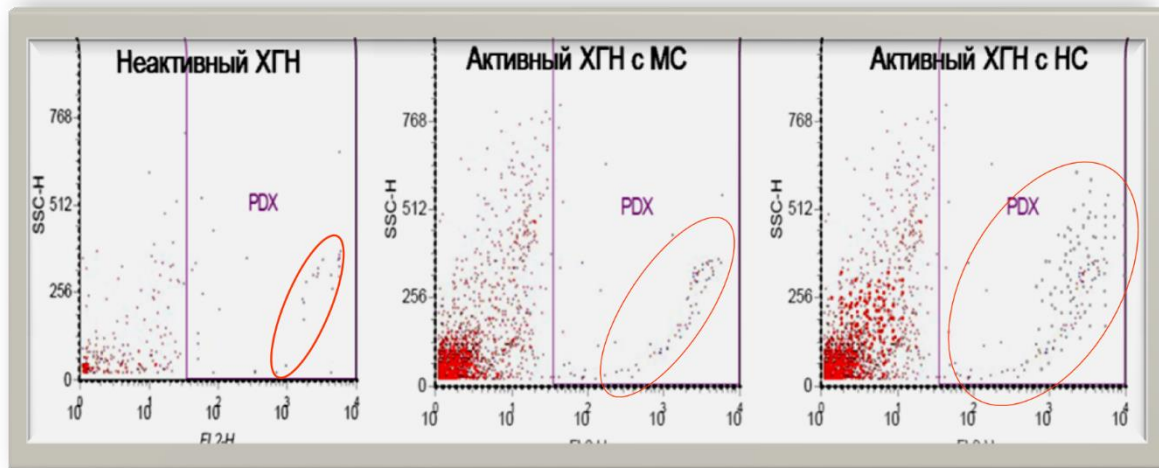
У больных с активным течением ХГН (как во II, так и в I группе) нефринурия была значимо выше (16,1 [12,5;27,8] нг/мл) при наличии артериальной гипертензии, чем у пациентов с нормальными цифрами артериального давления (10 [8,4;14,6] нг/мл), $p < 0,01$. Выявлена прямая корреляция между показателями нефринурии и цифрами систолического и диастолического артериального давления (таб. 7). Та же закономерность получена и у больных с неактивным течением ХГН: при одинаково низкой ПУ показатель нефринурии был достоверно выше у больных с артериальной

гипертензией (9,3 [7,7; 11,0] нг/мл vs 6,0 [1,2-6,8] нг/мл у пациентов с нормальными показателями артериального давления, $p < 0,01$).

Эти результаты подтверждают данные о дополнительном повреждающем воздействии системной артериальной гипертензии, а также внутриклубочкового давления на подоциты и экспрессию генов белков щелевой диафрагмы, в том числе нефрина, продемонстрированные во многих исследованиях при диабетической нефропатии и гипертоническом нефроангиосклерозе [25, 70, 94, 327]. Установлено, что внутриклубочковая гипертензия может приводить к механическому растяжению подоцитов, повреждать целый комплекс адгезивных белков, укрепляющих подоциты на БМК, и разрушать компоненты щелевой диафрагмы [174]. Кроме того, на поверхности подоцитов обнаружены рецепторы к ангиотензину I и II типа, и введение ангиотензина в эксперименте у крыс, помимо развития артериальной гипертензии, сопровождалось апоптозом подоцитов и уменьшением экспрессии нефрина [130]. Введение крысам другого компонента ренин-ангиотензиновой системы (РААС) - альдостерона также вызывало подоцитарное повреждение и снижение экспрессии нефрина, как полагают, за счет усиления окислительных процессов и активации фосфорилирования белков [277]. Следовательно, наряду с факторами воспаления значительное повреждающее воздействие на подоциты может оказывать активированная, в том числе локальная внутрипочечная РААС.

3.1.2 Уровень подоцитурии у больных хроническим гломерулонефритом

Помимо белка щелевой диафрагмы нефрина методом цитофлоуметрии с использованием антител к поверхностному антигену подоцитов подокаликсину была изучена экскреция с мочой слущенных подоцитов и их фрагментов - подоцитурия (рис. 10).



В левой области представленных цитограмм наблюдается скопление клеток осадка мочи больных ХГН с отсутствием поверхностного антигена подокаликсина. Красным цветом в правой области отмечены клетки, меченые антителами к подокаликсину (подоциты), в осадке мочи больных ХГН.

Рисунок 10. Цитограммы осадка мочи (метод цитофлоуметрии) у больных ХГН с различной выраженностью протеинурии

Так же, как и уровень нефринурii, величина подоцитурии была достоверно выше у пациентов с активным течением ХГН, чем у пациентов с ремиссией заболевания и у здоровых лиц (таб. 8). У больных с НС (группа II) этот показатель был выше, чем у пациентов с субнефротической протеинурией (I гр.). Особенно высокие значения отмечались при тяжелом течении НС, свидетельствуя о нарушении целостности гломерулярного барьера и об активном слущивании подоцитов в мочевое пространство при массивной протеинурии (таб. 8).

Как и для нефринурii, выявлены достоверные корреляции показателя подоцитурии с величиной протеинурии, а также длительностью персистирования нефротического синдрома, что свидетельствует о нарастающей со временем тяжести повреждения подоцитов у больных с НС (таб. 8). Между показателями подоцитурии и нефринурii отмечена сильная прямая связь, подтверждающая это положение ($R_s=0,9$, $p<0,05$).

Таблица 7

Взаимосвязь показателей подоцитарного повреждения - подоцитурии, нефринурии, уровня в моче БТШ27 с лабораторными признаками активности ХГН

Показатель	Подоцитурия	Нефринурия	БТШ-27
Протеинурия, г/сут	$R_s = 0,23, p < 0,05$	$R_s = 0,27, p < 0,05$	$R_s = 0,297, p < 0,05$
Альбумин сыворотки крови, г/л	$R_s = -0,38, p < 0,001$	$R_s = -0,27, p < 0,05$	$R_s = -0,356, p < 0,05$
Эритроцитурия (выраженность)	$R_s = 0,13, p = 0,52$	$R_s = -0,26, p < 0,05$	$R_s = 0,03, p = 0,8$
Креатинин сыворотки, мг/дл	$R_s = 0,09, p = 0,56$	$R_s = 0,49, p < 0,001$	$R_s = 0,03, p = 0,86$
СКФ мл/мин, в пробе Реберга	$R_s = 0,01, P = 0,89$	$R_s = -0,11, p = 0,7$	$R_s = -0,18, p = 0,32$
АД сист. мм рт. ст	$R_s = 0,22, P = 0,13$	$R_s = -0,3, p < 0,05$	$R_s = 0,07, p = 0,7$
АД диаст. мм рт. ст	$R_s = 0,27, P = 0,1$	$R_s = -0,41, p < 0,05$	$R_s = -0,3, p = 0,09$
длительность НС, мес	$R_s = 0,42, P < 0,05$	$R_s = 0,4, p < 0,05$	$R_s = 0,16, p = 0,31$

Таблица 8

Показатель подоцитурии у больных хроническим гломерулонефритом

Группы обследованных	n	Подоцитурия, (pdx+кл/мкл)
Здоровые	10	0[0;0,6]
ХГН I группа (с выраженным МС)	23	5,45 [2,5;18,3]
ХГН II группа (НС)	38	12,0 [7,0;35,0] **
Умеренный НС	28	8,0 [4,2;15,5]
Тяжелый НС	10	36,5[9,0; 80,3]
ХГН III группа (ремиссия)	20	5,4[1,0;9,43]

* - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми и группой I, ** $p < 0,01$ по сравнению с группами I, II

Однако в отличие от показателя нефринурии для подоцитурии не было установлено достоверных корреляций с величиной креатинина, скорости клубочковой фильтрации и артериального давления (таб. 7). Таким образом, величина подоцитурии напрямую зависела только от выраженности протеинурии.

3.1.3 Уровень белка теплового шока 27 в моче больных ХГН

Кроме непосредственных маркеров повреждения подоцитов (нефринурии и подоцитурии) была изучена экскреция с мочой БТШ 27, который рассматривают в настоящее время как один из маркеров подоцитарного стресса.

У больных группы I показатель БТШ 27 в моче в среднем не отличался от такового у больных с ремиссией ХГН и у здоровых лиц. Достоверное увеличение экскреции БТШ27 с мочой отмечалось у больных группы II с НС, особенно при тяжелом течении НС (высокой протеинурией более 10 г/сут, снижением уровня альбумина сыворотки менее 20 г/л) (таб. 9).

Таблица 9

Показатель БТШ-27 в моче больных хроническим гломерулонефритом

Показатель Группа	БТШ-27 (нг/мл)
Здоровые (n=10)	0,73 [0,66; 0,96]
I.ХГН с МС (n=34)	0,76 [0,68; 1,14]
II.ХГН с НС (n=30)	1,1 [0,73; 1,83] *
умеренный НС (n=23)	0,94 [0,71; 1,73]
тяжелый НС (n=7)	1,88 [0,8; 7,195] **
III. Ремиссия ГН (n=10)	0,72 [0,65; 0,98]

*p<0,05, **p<0,01

У больных активными формами ХГН выявлены корреляции между показателем в моче БТШ 27 и уровнем протеинурии, а также белков сыворотки крови, степень снижения которых свидетельствует о тяжести НС (рис. 11, 12). У больных группы II с нефротическим синдромом сила связи была несколько выше ($R_s=0,37$, $p<0,05$).

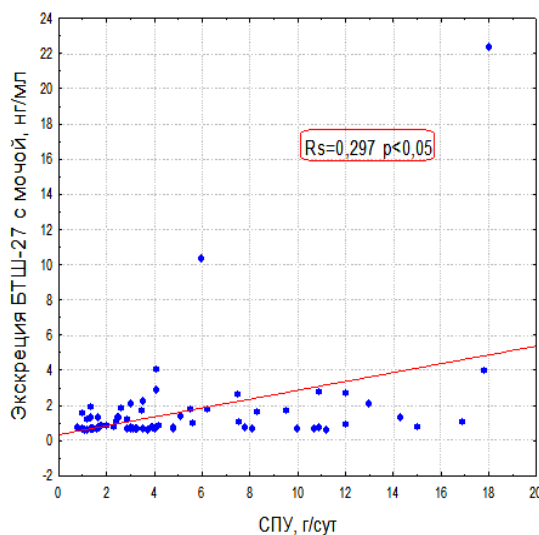


Рисунок 11. Зависимость показателей БТШ27 в моче и суточной протеинурии у больных ХГН

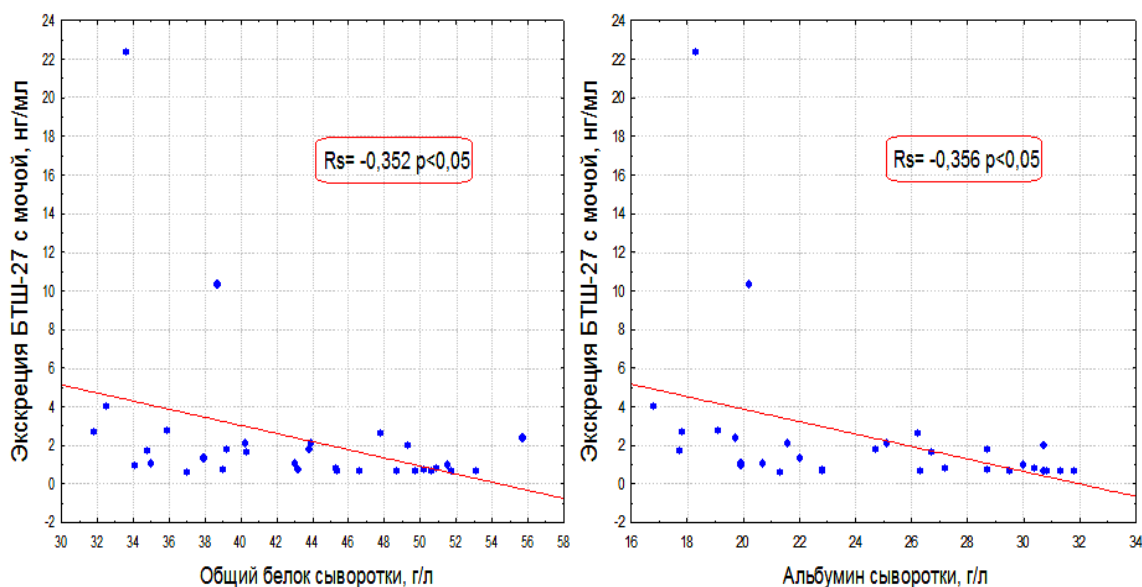


Рисунок 12. Зависимость показателя БТШ27 в моче и белков сыворотки крови у больных ХГН

Не было выявлено связи между уровнем экскреции исследуемых факторов с мочой и конкретными морфологическими формами ХГН, решающее значение имела выраженность нефротического синдрома (рис. 13). В нашем исследовании наиболее высокие показатели нефринурии отмечались у 3 больных с мембранозной нефропатией (49; 51,2; 56,7 нг/мл) и у 1 - с мезангиокапиллярным ГН (51 нг/мл), подоцитурии - у больных с МИ (1200 частиц в мкл) и ФСГС (296,7 частиц в мкл), БТШ-27 в моче – у больных фокально-сегментарным гломерулосклерозом -22,4 нг/мл и мембранозной нефропатией -15,37 нг/мл, то есть при «первичных подоцитопатиях», для которых характерна высокая протеинурия, определяющая тяжесть нефротического синдрома.

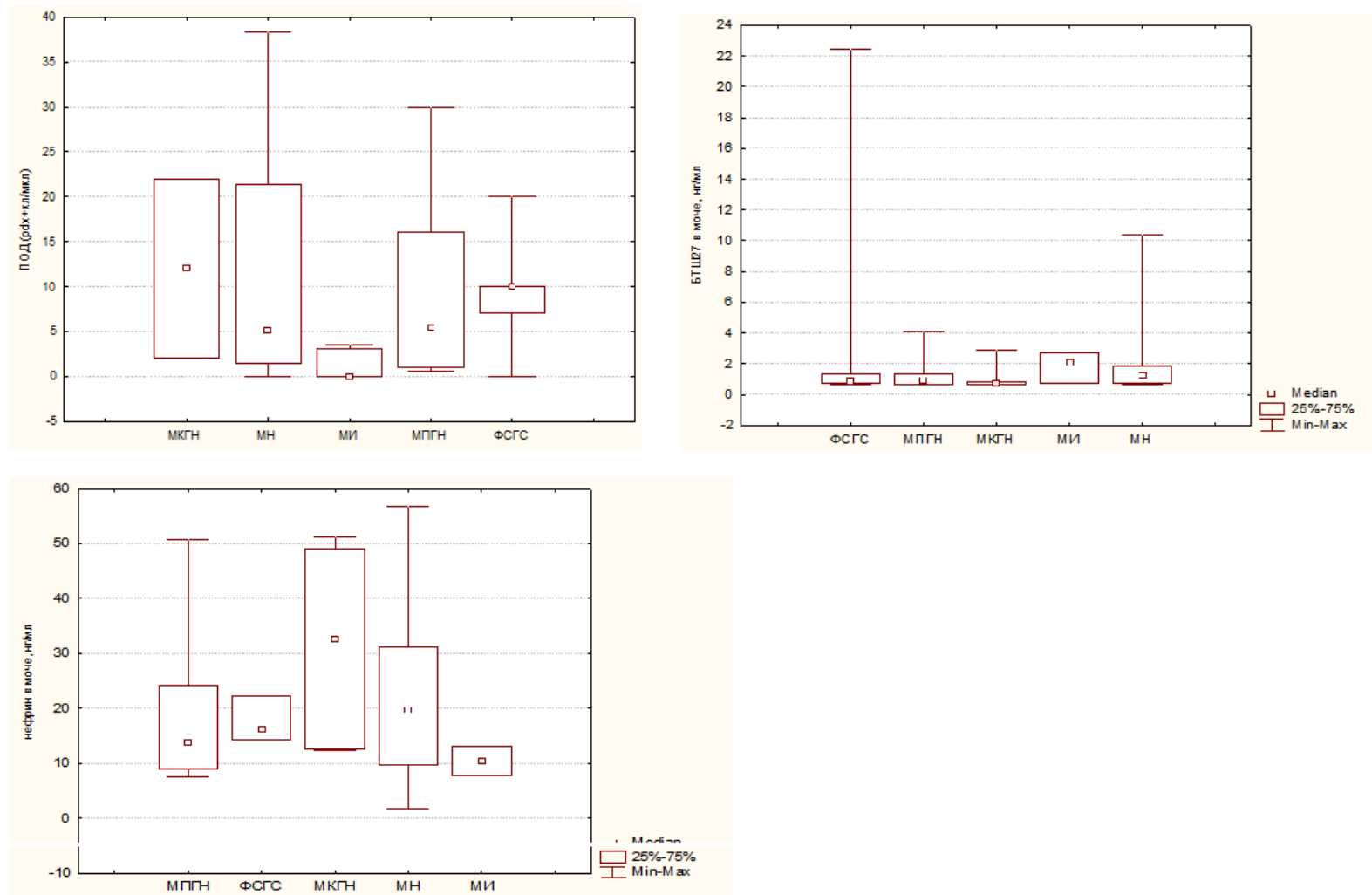


Рисунок 13. Показатели подоцитарного повреждения - нефринурия, подоцитурия, БТШ27 в моче больных с различными морфологическими формами ХГН (n=105)

3.1.4 Соотношение показателей подоцитарного повреждения: нефринурии, подоцитурии и БТШ 27 в моче больных ХГН

Между тремя изученными показателями (подоцитурией, нефринурией, уровнем в моче БТШ-27) были выявлены достоверные связи, наиболее сильные у больных с НС, что позволяет их рассматривать как патогенетически связанные маркеры подоцитарной дисфункции, с одной стороны, и дает основание предполагать нарушения взаимодействия с «системой самозащиты почки» (белки теплового шока) на территории подоцита, с другой стороны (рис. 14).

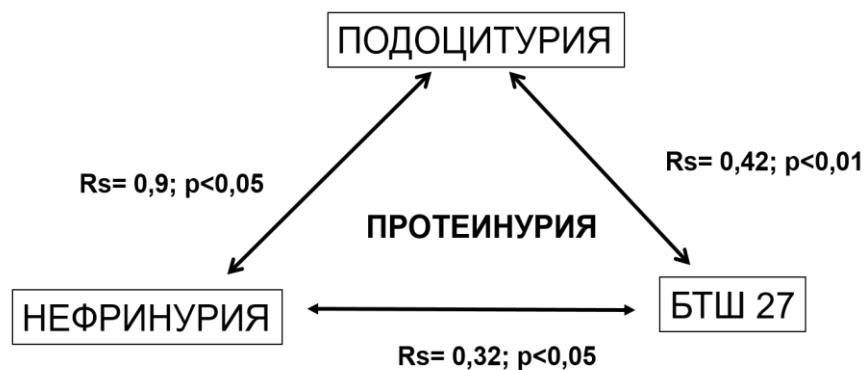


Рисунок 14. Взаимоотношения показателей подоцитарной дисфункции у больных ХГН

3.2 Значение воспалительных цитокинов как факторов повреждения подоцитов у больных ХГН

3.2.1 Уровень моноцитарного хемотаксического протеина-1 и интерлейкина-6 в моче больных ХГН

Для оценки вклада иммуно-воспалительных механизмов в процесс повреждения подоцитов в сопоставлении с экскрецией маркеров подоцитарной дисфункции была изучена экскреция с мочой провоспалительного хемокина – МСР-1 и цитокина – ИЛ-6.

МСР-1 СС хемокин играет важную роль в прогрессировании гломерулонефрита как за счет повреждения тубуло-интерстиция почки, так и за счет гломерулярного поражения. Обсуждается непосредственное влияние МСР-1 на подоциты и их роль в развитии протеинурии. У больных с высокой протеинурией (группа I и II) экскреция с мочой МСР-1 и ИЛ-6 была достоверно выше, чем у больных с ремиссией ХГН и у здоровых лиц (таб. 10 и рис. 15).

У больных ХГН с НС (группа II) уровень ИЛ-6 и МСР-1 в моче был выше, чем у больных с МС (группа I). Для ИЛ-6 выявлены прямые корреляции с протеинурией, г/сут ($R_s=0,51$ и $0,55$, $p<0,001$) и обратные корреляции с альбумином сыворотки крови ($R_s = -0,45$, $p<0,001$). Для МСР-1 установлены однонаправленные корреляции с суточной протеинурией ($R_s=0,378$, $p=0,01$) и обратные - с альбумином ($R_s= -0,389$, $p<0,05$). Кроме того, у больных с НС, артериальной гипертензией и нарушением функции почек, т.е. при наиболее высокой клинической активности ХГН, экскреция с мочой МСР-1 и ИЛ-6 достоверно превышала этот показатель у пациентов с сохранной функцией почек ($29 [19;57]$ vs $7,85 [4,6;16]$ пг/мл для МСР-1, $p<0,05$ и $22 [10,2;92,5]$ нг/мл vs $8,27 [1,48;16,35]$ нг/мл соответственно, $p<0,05$ для ИЛ-6). Уровень МСР-1 и ИЛ-6 в моче больных ХГН с НС коррелировал прямо с величиной креатинина сыворотки крови и обратно – со скоростью клубочковой фильтрации (рис. 16, 17). При тяжелом НС, проявляющимся массивной ПУ более 10 г/сут, гипоальбуминемией ≤ 20 г/л, наряду с показателями ПодУ и БТШ-27 в моче, уровень

провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и МСР-1 был также достоверно выше, чем при умеренном НС (таб. 10 и рис. 18).

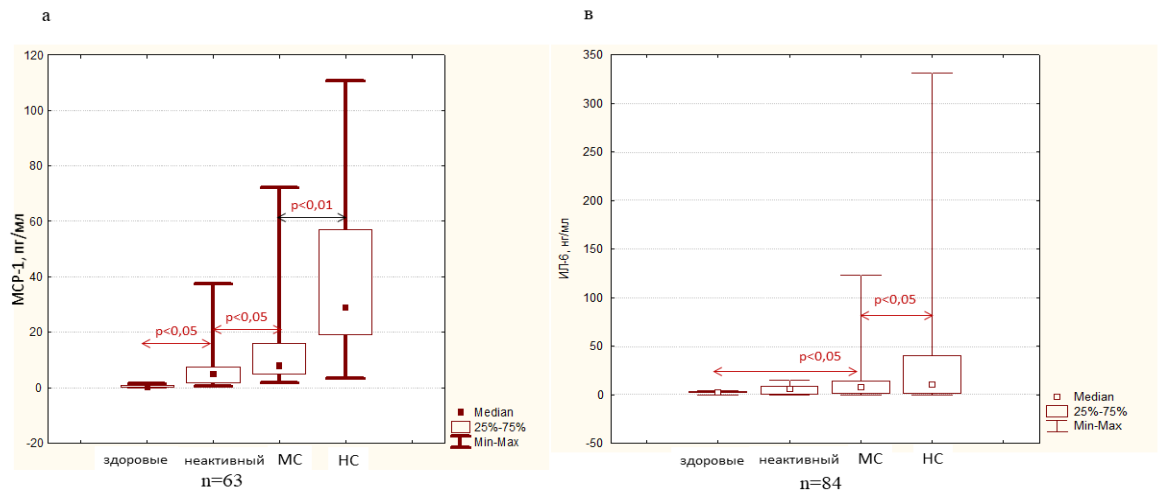


Рисунок 15. Экскреция МСР-1 и ИЛ-6 с мочой больных ХГН

Таблица 10

Уровень экскреции с мочой провоспалительных цитокинов МСР-1, ИЛ-6 в сравнении с подоцитурией и показателем БТШ-27 в моче больных ХГН

Группа	ИЛ-6 в моче (нг/мл)	МСР-1, нг/мл	БТШ-27, нг/мл	Подоцитурия
Здоровые (n=10)	2,05 [1,05; 4,26]	0,34 [0,21; 0,86]	0,73 [0,66; 0,96]	0[0;0,6]
ХГН с МС (n=34)	5,44 ° [1,3; 12,8]	8,1 [4,6;30] °	0,76 [0,68; 1,14]	5,45 [2,5;18,3]
ХГН с НС (n=30)	9,97 ° * [1,95; 25,6]	15,35 [6;39] *	1,1 * [0,73; 1,83]	12,0 [7,0;35,0]
НС умеренный (n=23)	9,21 ° [0,45; 16,38]	12,25 [6,4;28]	0,94 [0,71; 1,73]	8,0 [4,2;15,5]
НС тяжелый (n=7)	11,2 ° * ▪ [2,61; 82,9]	13,7 [4,35;48]	1,88 * ** [0,8; 7,195]	36,5[9,0; 80,3] **
ХГН ремиссия (n=10)	5,35 [0,41; 13,1]	2,9 [1,7;5,8] °	0,72 [0,65; 0,98]	5,4[1,0;9,43]

В таблице представлена медиана и интерквартильный размах [перцентиль 25; 75 %]

° p<0,05 по сравнению со здоровыми

* p<0,05 по сравнению с больными с ремиссией ГН (группа III) и ХГН с МС (группа I)

▪ p<0,05 по сравнению с ХГН с умеренным НС (группа IIa)

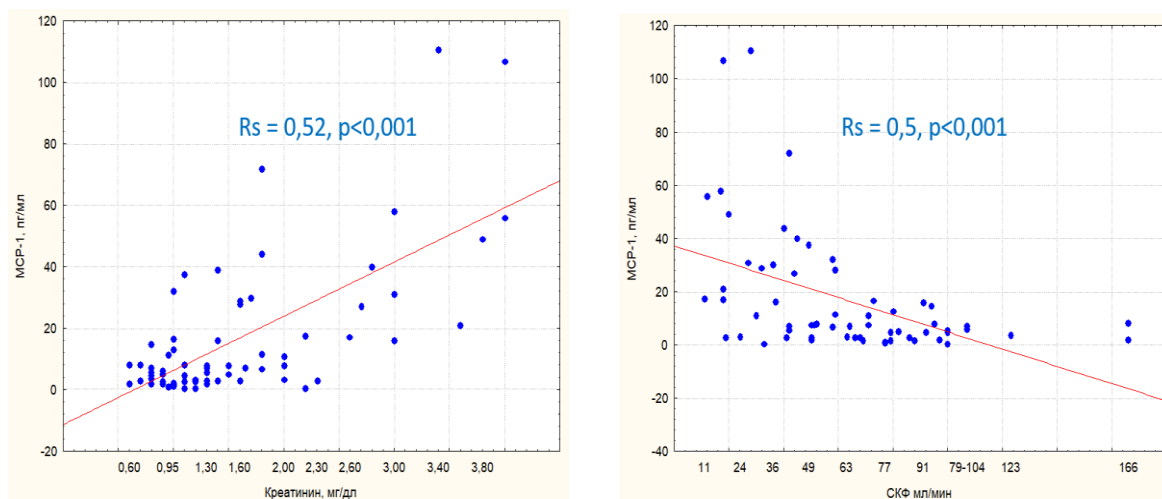


Рисунок 16. Экскреция МСР-1 с мочой в зависимости от креатинина сыворотки крови и скорости клубочковой фильтрации (расчетная по формуле СКД-ЕРІ) у больных с НС

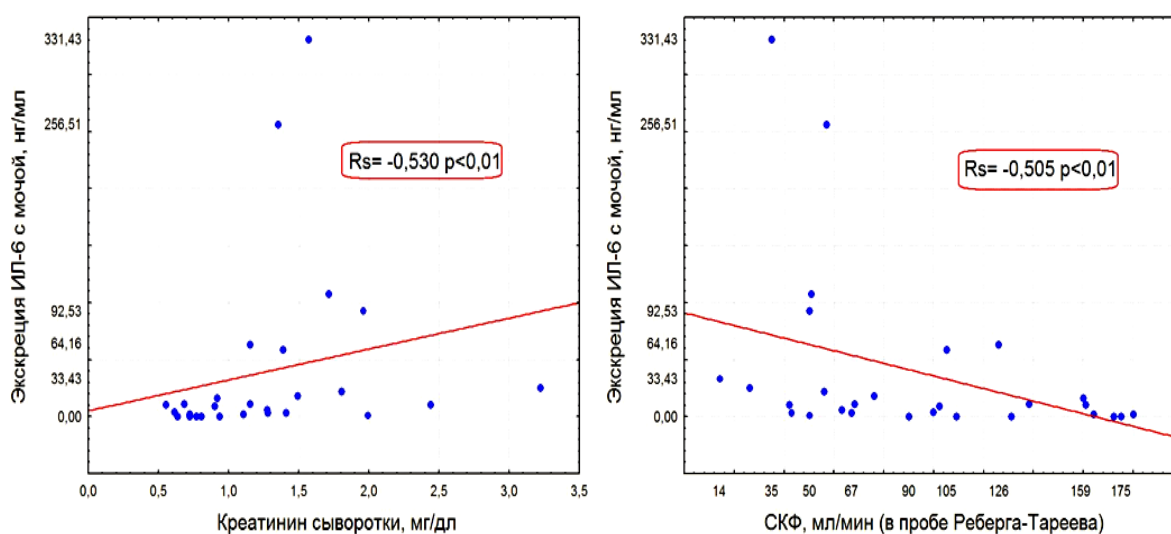


Рисунок 17. Экскреция ИЛ-6 с мочой в зависимости от креатинина сыворотки крови и скорости клубочковой фильтрации (расчетная по формуле СКД-ЕРІ) у больных с НС

Установлена корреляция между выраженностью ПодУ и уровнем в моче БТШ-27, а также между мочевыми показателями БТШ-27 и ИЛ-6, особенно тесные в группе больных ХГН с НС (рис. 19), что подтверждает роль подоцитарного повреждения в развитии иммунного воспаления в клубочках и формировании НС.

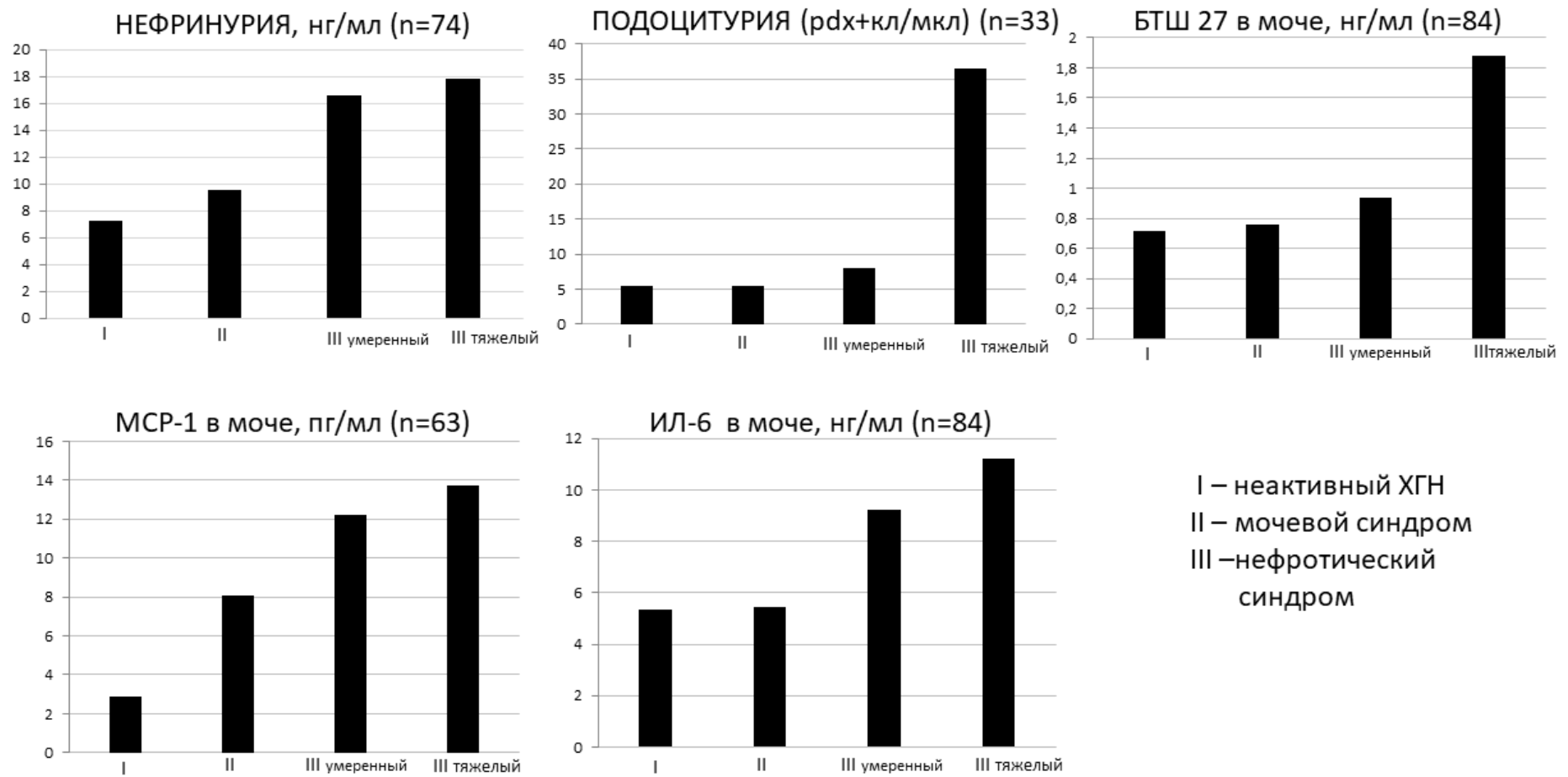
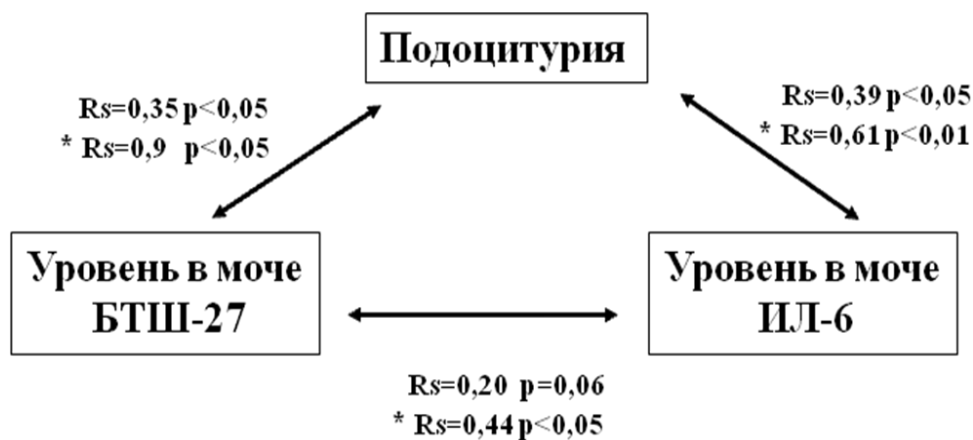


Рисунок 18. Соотношение показателей подоцитарного повреждения и провоспалительных цитокинов у больных ХГН

как яркого клинического эквивалента воспаления в почке и его активности у больных ХГН.



*- у больных ХГН с НС

Рисунок 19. Взаимосвязь показателей подоцитурии, экскреции с мочой БТШ-27, ИЛ-6 у больных ХГН

3.3 Экскреция факторов апоптоза/выживаемости подоцитов у больных ХГН

Структурно-функциональное повреждение подоцитов, отслоение от гломерулярной базальной мембраны и слущивание их в мочу является основным механизмом потери подоцитов и развития подоцитопении при ХГН. Важной составляющей структурно-функциональных изменений подоцитов, клинически проявляющихся протеинурией, является активация апоптоза этих клеток, который может быть изучен с помощью определения экскреции с мочой показателя апоптоза - каспазы -9 - в сравнении с информативным показателем подоцитарной дисфункции – нефринурией.

Каспаза 9 – это каспаза семейства цистеиновых протеаз, которая играет важную роль в сигнальной цепочке апоптоза, представляя «верхний» узел протеазного каскада этой цепочки после сборки апоптосомы [179]. После активации апоптосомой каспаза 9 в свою очередь активирует каспазу-3 и вызывает гибель клетки.

У пациентов с НС (группа II) уровень каспазы-9 в моче значимо выше, чем у больных с мочевым синдромом (группа I) (рис. 20). Уровень каспазы-9 нарастал параллельно повышению уровня нефринурии, что указывает на вклад процессов апоптоза в подоцитарное повреждение, приводящее к развитию протеинурии у больных ХГН (таб. 11 и рис. 21).

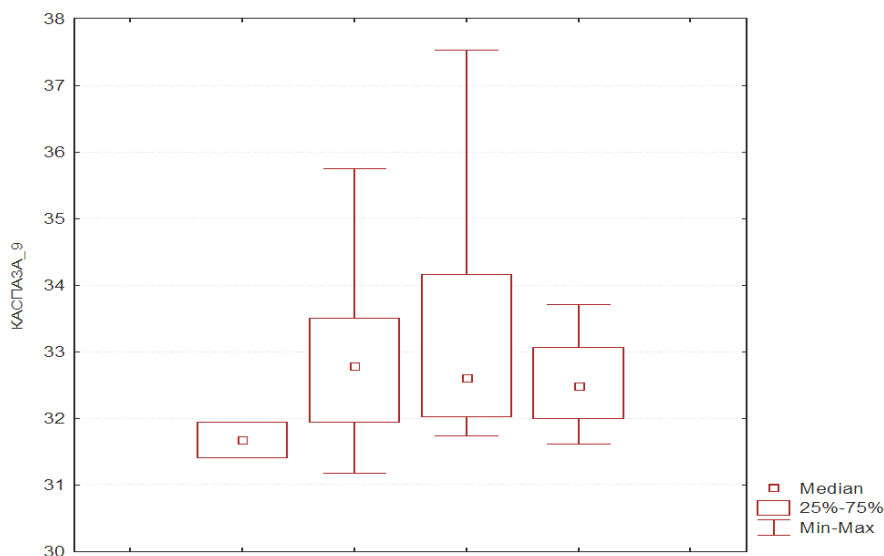


Рисунок 20. Экскреция каспазы -9 с мочой больных ХГН (n=78)

В сопоставлении с нефринурией и показателем каспазы-9 в моче был изучен уровень экскреции с мочой одного из основных факторов, противостоящих апоптозу подоцитов - сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF).

При неактивном течении ХГН уровень VEGF в моче не отличался от такового у здоровых, у пациентов с выраженным МС имел тенденцию к повышению, а у больных с НС отличался вариабельностью. При отдельном анализе мочевой экскреции VEGF у больных ХГН с НС было выявлено достоверное ее повышение у пациентов с сохранной функцией почек (без почечной недостаточности – ПН) и резкое снижение у больных с прогрессирующим течением ХГН с НС и нарушением функции почек (ПН) (таб. 11 и рис. 22).

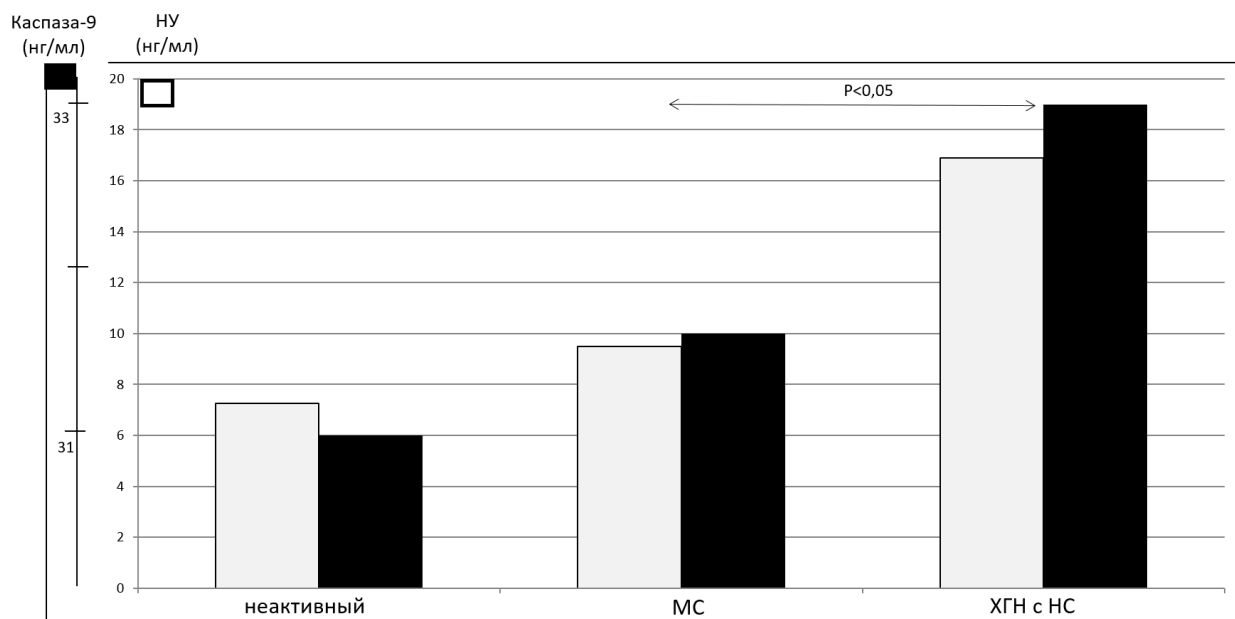


Рисунок 21. Соотношение экскреции с мочой каспазы-9 и нефрина у больных ХГН (n=74)

Величина мочевого показателя VEGF у больных активным ХГН с сохранной функцией почек коррелировала с уровнем протеинурии ($R_s=0,673$ $p<0,0001$), а у пациентов с почечной дисфункцией и нарушением функции почек степень снижения VEGF в моче была связана с уровнем креатинина сыворотки крови ($R_s=-0,31$ $p<0,05$).

У больных с активным прогрессирующим течением ХГН с нарушением функции почек, выявлялись и наиболее высокие показатели нефрина в моче (рис. 3.16), при этом была получена обратная корреляция между величиной экскреции с мочой VEGF и выраженностью нефринурii ($R_s=-0,8$, $p<0,05$).

Таблица 11

Группа обследованных	n	Нефрин, нг/мл	Каспаза-9, нг/мл	VEGF (нг/мл)
Здоровые	10	7,9 [1,7; 9,5]	31,0 [31,2;31,6]	62,2 [54,85-73,5]
ХГН с МС	23	9,5 [7,6; 13] ■	31,4[31,3; 32,35]	73,5[59,4-90,2] ■
ХГН с НС	30	16,9 [10,9; 27,8]	33, 0 [32,0; 34,1]	96,7 [61,0;136,4]
без ПН	19	14,8 [10,26,8] *	32,8 [31,0; 34,0] *	125,2 [94,6-179,7] *
с ПН	11	20,45 [16,3;49] *▲	33,2 [32,0; 34,5] *	54,65 [38,7-71,5]*▲
ХГН (неактивный)	20	7,25 [5,4; 9,8]	31,0 [31,0;32,0]	64,1[53,9-75,6]

Экскреция нефрина, каспазы-9 и VEGF с мочой больных ХГН (n=67)

Представлены медиана, интерквартильный размах [перцентили 25,75%]

p<0,05, * - vs здоровые, ▲ - vs больные ХГН с МС (группа I)

■ - по сравнению с ремиссией ХГН (группа III)

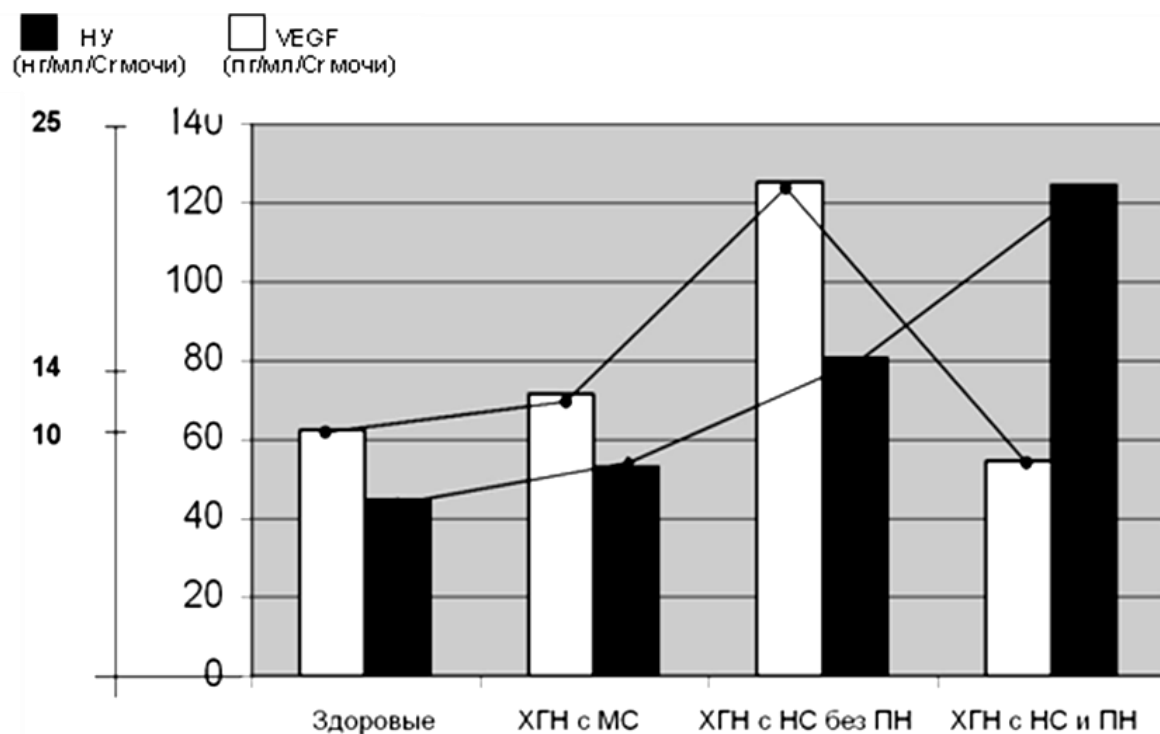


Рисунок 22. Изменение экскреции нефрина и VEGF с мочой у больных с различной активностью ХГН

Таким образом, при неуклонном нарастании показателей подоцитарной дисфункции и нефринурии у больных с НС отмечалось параллельное повышение экскреции с мочой фактора выживаемости подоцитов (VEGF) и его резкое снижение при присоединении почечной недостаточности (рис. 23). Нарушение соотношения этих биомаркеров и истощение продукции VEGF у больных прогрессирующими формами ХГН можно рассматривать как следствие снижения числа подоцитов – развития подоцитопении в клубочках за счет прогрессирующей потери подоцитов с мочой, что клинически проявляется высокой протеинурией и нарушением функции почек из-за сопутствующего подоцитопении нарастающего гломерулосклероза.

3.4 Результаты иммуногистохимического метода оценки подоцитопении у больных ХГН

Прогрессирующая потеря подоцитов в клубочках почек при активных формах ХГН была подтверждена иммуногистохимическим методом исследования почечного биоптата с оценкой числа подоцитов, меченых по ядерному маркеру - антигену опухоли Вильмса (WT-1). Установлено, что количество экспрессирующих WT-1 ядер у больных с НС было снижено (21 [16, 27,5] кл/срез клубочков) по сравнению с контролем (44 [38; 47] кл/срез клубочка), что подтверждает прогрессирующую потерю подоцитов в клубочках почек при активных протеинурических формах ХГН. В клубочках почек больных с тяжелым НС выявлено значительное обеднение экспрессии WT-1, отражающее уменьшение подоцитарного слоя гломерулярного фильтра (рис. 24). Полученные результаты представляют особый интерес с точки зрения современных данных о том, что степень подоцитопении является важной детерминантой развития гломерулосклероза.

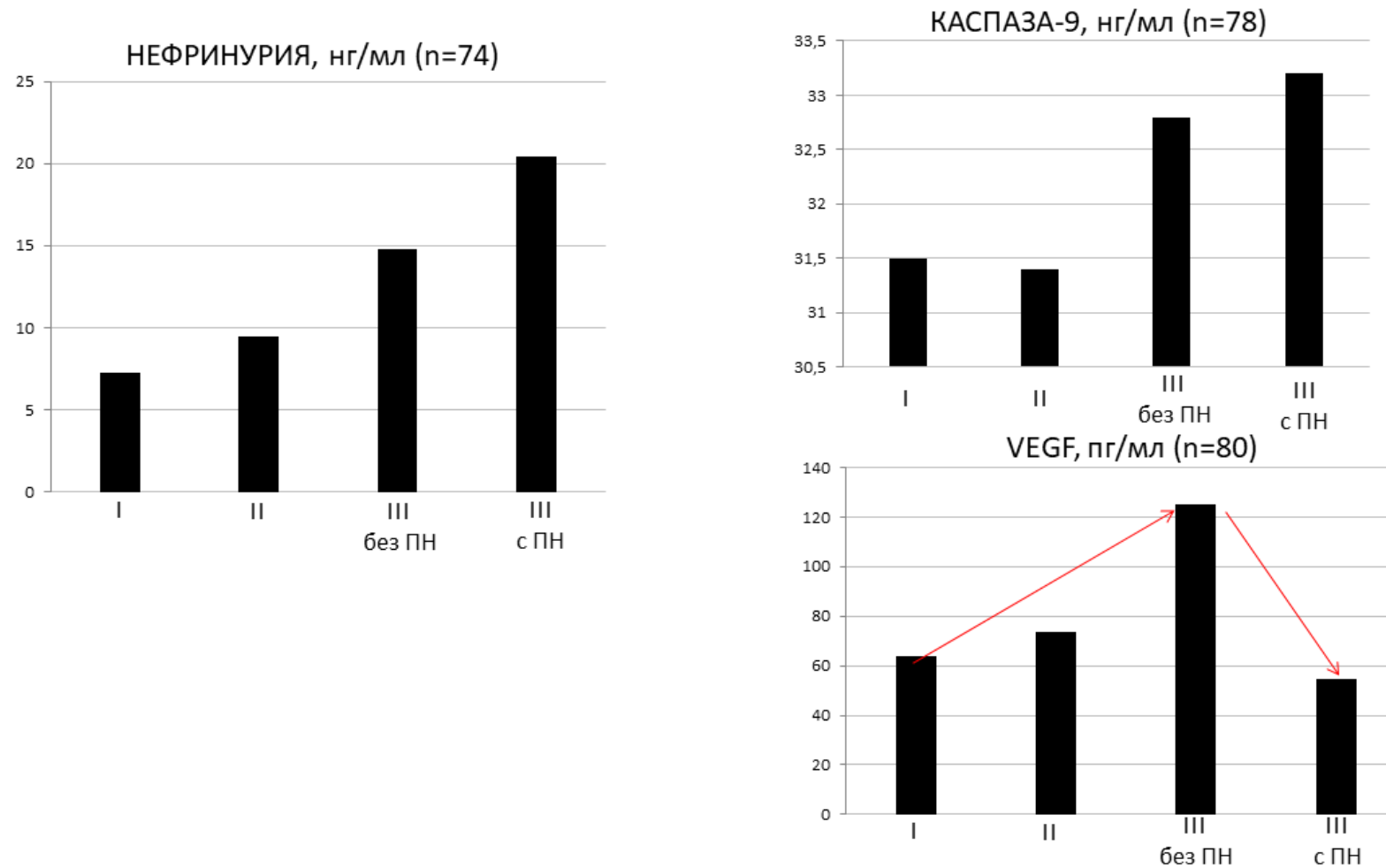


Рисунок 23. Соотношение показателей нефринурии, апоптоза и выживаемости подоцитов у больных ХГН

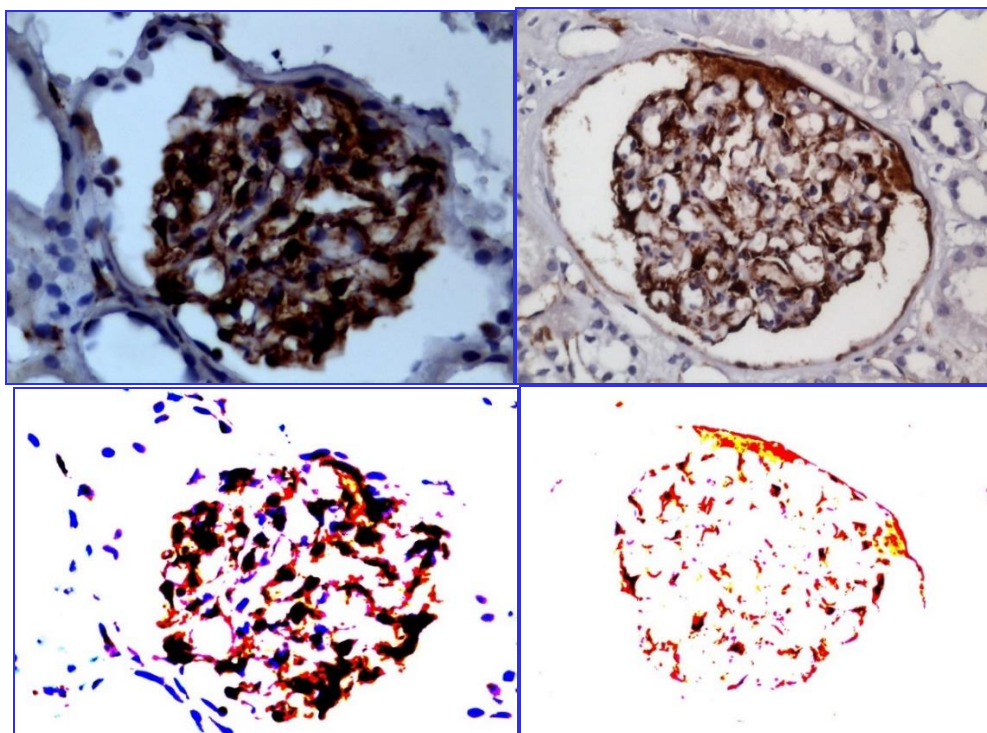


Рисунок 24. Экспрессия WT-1 в клубочках почек по результатам иммуногистохимического исследования

У больных с нефротическим синдромом, у которых не было получено ответа на проводимую иммуносупрессивную терапию, степень подоцитопении была более выражена (16 [14;20] кл/срез кл), т.е. в случаях, когда количество подоцитов в клубочках почек снижалось более, чем в 2 раза (более чем 50%), чем у больных, у которых удалось достичь ремиссии нефрита в результате проводимой иммуносупрессивной терапии (30 [23;33] кл/срез кл) – около 31% потери общего числа подоцитов (рис. 25).

Выявлена обратная достоверная корреляция выраженности экспрессии WT-1 в клубочках, отражающая степень подоцитопении, с величиной протеинурии ($R_s = -0,35$, $p < 0,05$) и подоцитурии ($R_s = -0,47$, $p < 0,05$) (рис. 25).

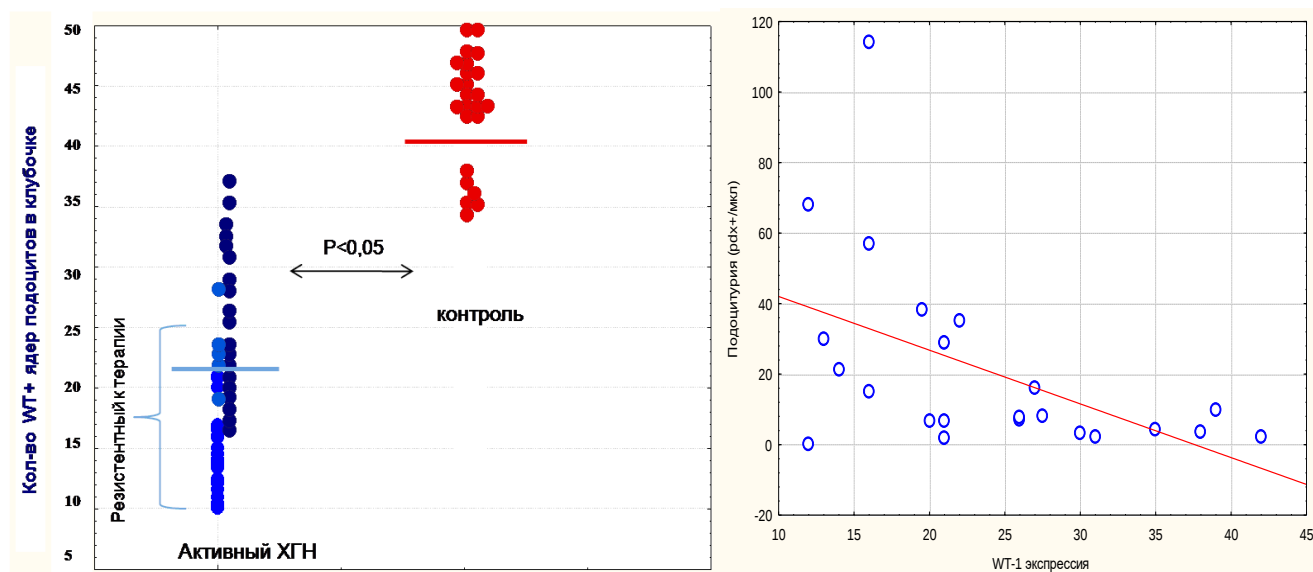


Рисунок 25. Оценка выраженности подоцитопении по экспрессии WT-1 у больных ХГН (n=40)

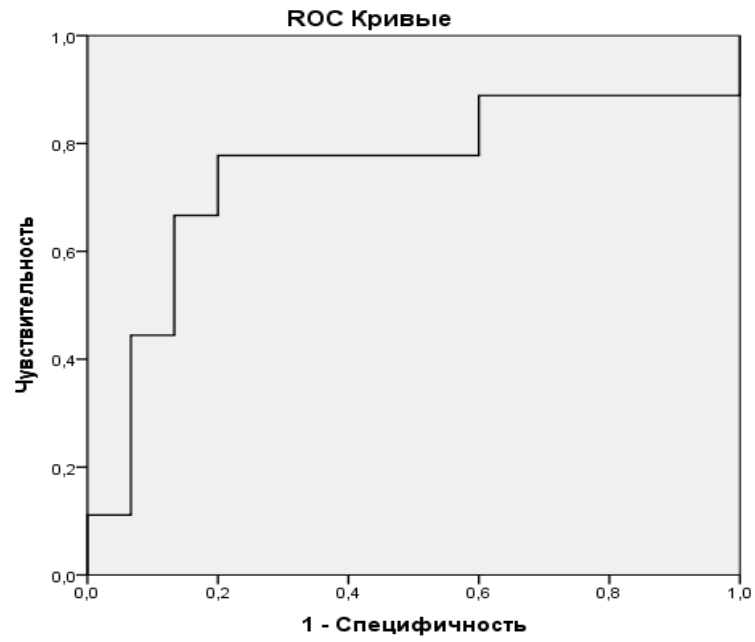
Нами получена формула, позволяющая рассчитывать степень подоцитопении на основании показателя подоцитурии, что может иметь практическое значение для неинвазивного мониторингирования процессов повреждения клубочков.

$$\text{Подоцитопения (\%)} = 61,4727 * \exp(-0,0046 * \text{ПОД}), \quad (1)$$

где Подоцитопения – показатель подоцитопении, выраженный в процентах (%);
exp – экспонента;

ПОД – показатель подоцитурии, выраженный в количестве экспрессирующих подокаликсин клеток в микролитре мочи (метод цитофлоуметрии).

Проведенный нами ROC-анализ продемонстрировал, что подоцитурия более 20кл/мкл является предиктором выраженной (более 50%) подоцитопении и, соответственно, риска гломерулосклероза, и может использоваться в клинике для оценки прогноза ХГН (рис. 26).



**Рисунок 26. Информативность подоцитурии как маркера подоцитопении
(AUC =0,748)**

3.5 Исследование факторов «системы самозащиты почки» у больных ХГН

3.5.1 Изучение БТШ 70 в моче, ткани почки и уровня анти- БТШ-70-антител в крови больных ХГН

Наряду с факторами повреждения подоцитов, изучены механизмы самозащиты, противостоящие повреждению/воспалению почечной ткани. Белки теплового шока (БТШ) выполняют широкий спектр защитных функций в клетке, участвуя в процессах синтеза и репарации поврежденных внутриклеточных белков, а также выполняя иммунорегуляторную функцию в процессе хронического воспаления. Помимо БТШ27, не менее важную роль в этих процессах отводят БТШ70.

3.5.1.1 Исследование БТШ-70 в моче больных ХГН

У больных ХГН I и II групп показатель БТШ 70 в моче был выше, чем у больных с ремиссией ХГН и у здоровых лиц (таб. 12). У больных II группы с НС достоверно выше, чем у больных I группы с МС (рис. 27). Самые высокие показатели были отмечены у больных с тяжелым НС, то есть массивной протеинурией свыше 10 г/сут, гипоальбуминемией менее 20 г/л (таб. 12). Выявлена прямая корреляция уровня БТШ70 в моче с показателем протеинурии (рис. 28) и креатинина сыворотки крови ($R_s = 0,34$, $p < 0,05$).

Не отмечено достоверных различий по показателю БТШ 70 среди больных с различными морфологическими типами ХГН. Наиболее высокие показатели экскреции БТШ70 с мочой отмечались у больных с тяжелым течением НС, у двоих - в сочетании с преходящим нарушением функции почек (ФСГС -1,628 нг/мл и МН -2,588 нг/мл).

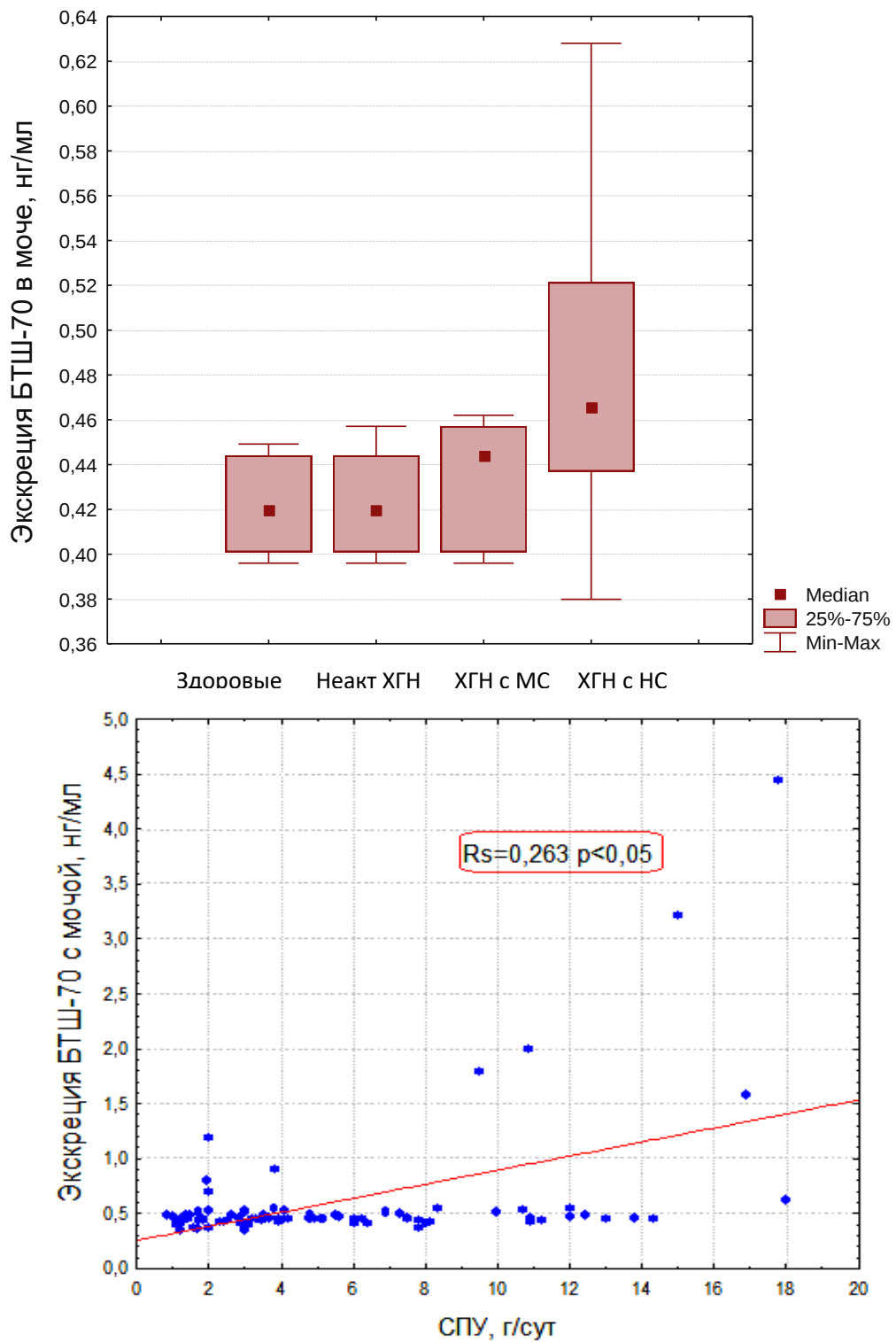


Рисунок 28. Корреляция между показателями БТШ-70 в моче и суточной протеинурии у больных ХГН (I и II группы)

3.5.1.2 Исследование БТШ-70 в ткани почек больных ХГН

Экспрессия БТШ-70 в ткани почки была выявлена у всех пациентов с активным течением ХГН и протеинурией более 1г/сут. Показатель экспрессии БТШ-70 в тубулоинтерстиции коррелировал с показателем БТШ-70 в моче ($R_s=0,948$ $p<0,05$), что свидетельствует о локально-почечном происхождении БТШ70 в моче. БТШ-70 экспрессировался преимущественно в эпителиальных клетках клубочка - подоцитах и париетальном эпителии Боуменовой капсулы. Помимо клеток клубочков БТШ-70 окрашивался в тубулярном эпителии, клетках интерстициального инфильтрата и миофибробластах (рис. 29, 30).

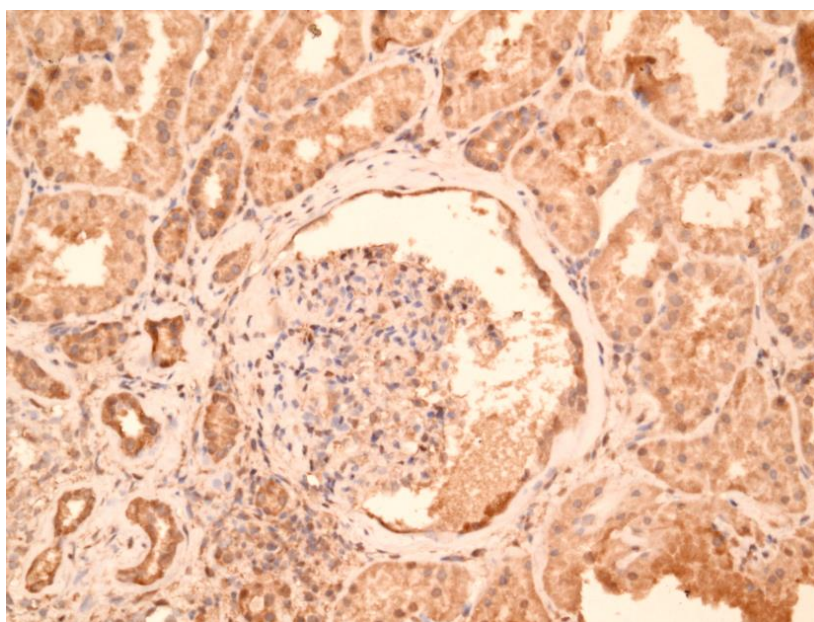


Рисунок 29. Экспрессия БТШ-70 в клубочках (париетальный эпителий, подоциты) и интерстиция (клетки стромы, тубулярный эпителий) у больного ХГН с мочевым синдромом (x200)

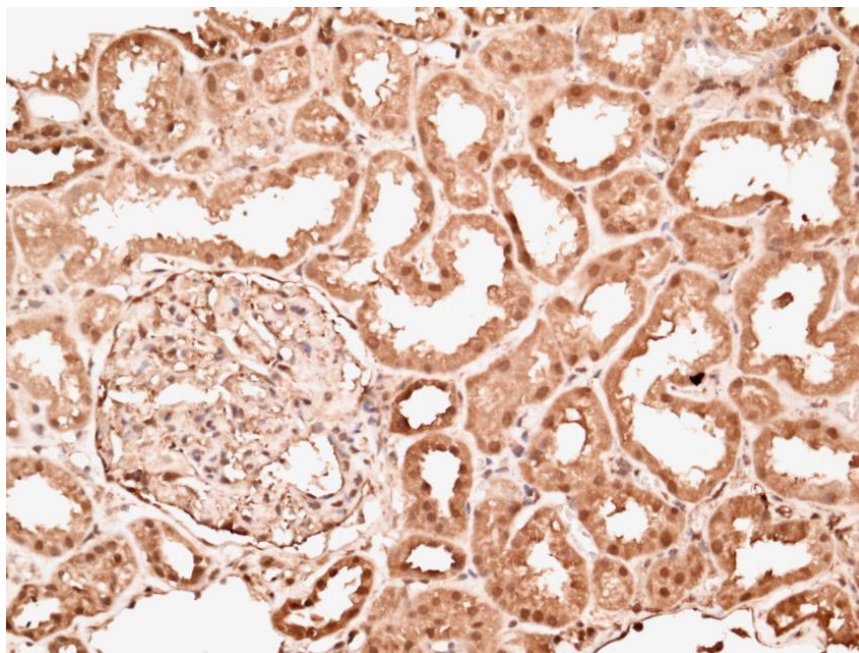


Рисунок 30. Экспрессия БТШ-70 в клубочках и интерстиции у больного ХГН с нефротическим синдромом (x200)

В клубочках почки свечение БТШ-70 было более интенсивным у больных с НС, однако разница не достигла статистической значимости (рис. 31). Интенсивность экспрессии в тубуло-интерстиции (тубулярных эпителиальных клетках, строме, клетках лимфогистиоцитарного инфильтрата) была достоверно большей у больных с НС (рис. 32), особенно с почечной дисфункцией, чем у больных с менее выраженной протеинурией (у 70% против 30 %), коррелируя с показателем протеинурии ($R_s=0,362$ $p<0,05$) (рис. 33, 34). Эти результаты можно рассматривать как свидетельство напряженности функционирования «системы самозащиты почки» при активном тяжелом течении протеинурических форм ХГН, ведущем к ремоделированию тубуло-интерстиция и развитию ПН.

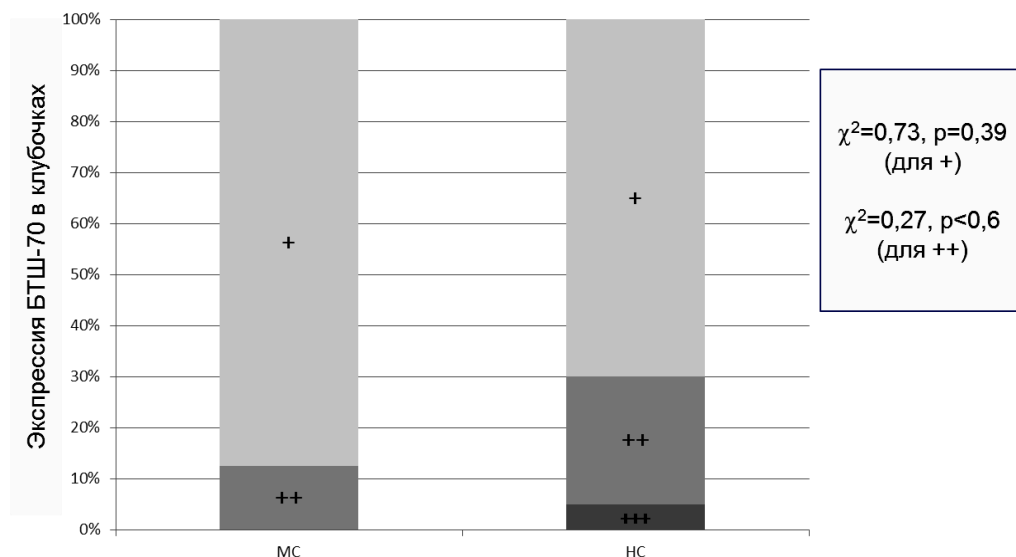


Рисунок 31. Интенсивность окрашивания БТШ-70 в клубочках почки больных ХГН (МС n=15, НС n=24)

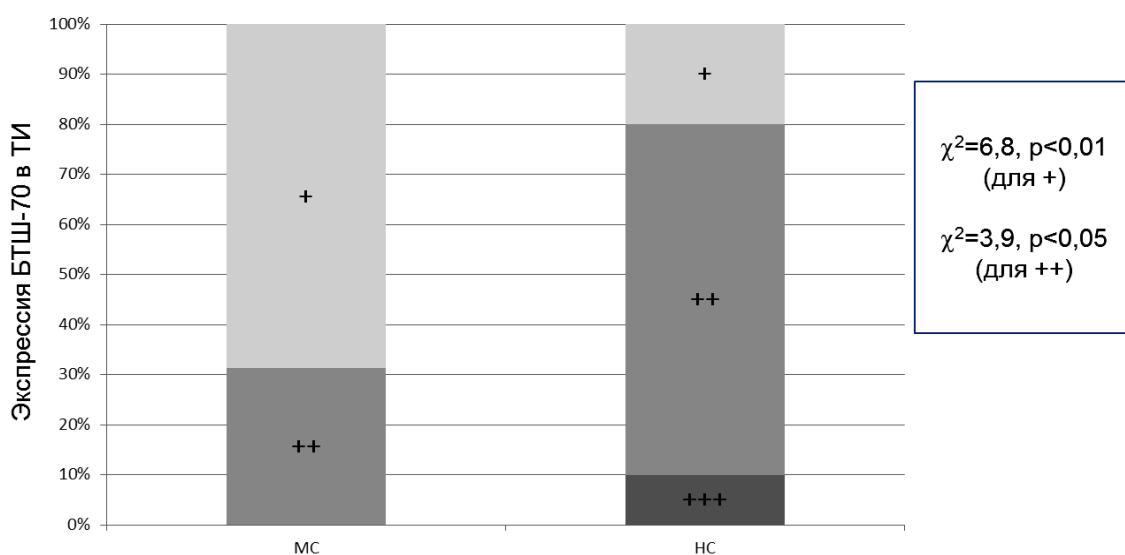


Рисунок 32. Интенсивность окрашивания БТШ-70 в интерстиции почки больных ХГН (МС n=15, НС n=24)

Интенсивность окрашивания : очаговая экспрессия слабой интенсивности (+), множественные очаги экспрессии умеренной интенсивности (++), множественные очаги экспрессии выраженной интенсивности (+++).

В клинической картине у пациентов с наличием в интерстиции экспрессии БТШ70 умеренной и выраженной интенсивности преимущественно отмечалось тяжелое течение ХГН с выраженным НС и почечной дисфункцией (рис. 33).

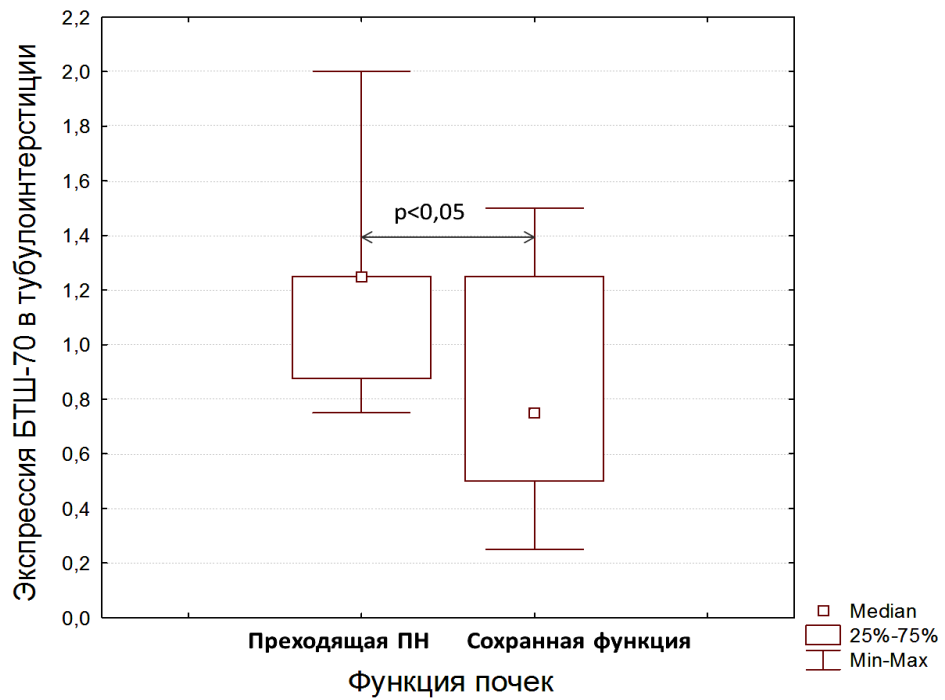


Рисунок 33. Показатель БТШ-70 в тубулоинтерстиции почек у больных с сохранной функцией почек и почечной дисфункцией

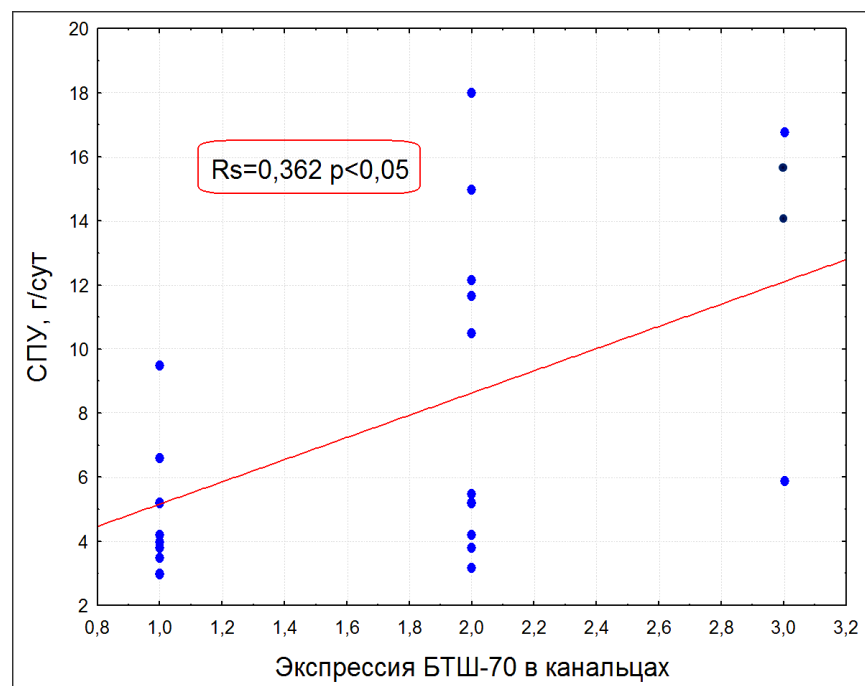


Рисунок 34. Экспрессия БТШ-70 в тубулярном эпителии почки больных активным ХГН в зависимости от показателя протеинурии (n=39)

3.5.1.3 Исследование антител к БТШ-70 в сыворотке крови больных ХГН

Иммунорегуляторная функция БТШ-70 была изучена с помощью определения в сыворотке крови больных ХГН уровня анти-БТШ-70 антител. К эпитопам БТШ-70, экспрессируемым на поверхности иммунных и резидентных клеток почки в очаге воспаления, образуются анти-БТШ-70 антитела. Отражением изменения метаболизма БТШ-70 в клетках почки является характер динамики антител к этому белку в сыворотке крови. Сывороточный уровень антител к БТШ-70 у обследованных нами (n=82) больных активным ХГН (как с мочевым – I гр., так и с НС – II гр.) был значимо выше, чем у пациентов с неактивным течением заболевания (III гр.) (таб. 12 и рис. 35). У больных группы II с НС показатель анти-БТШ70-антител был ниже, чем у больных группы I с меньшей протеинурией (рис. 35). Выявлена обратная корреляция между уровнем анти-БТШ-70 антител и суточной протеинурией (рис. 36), наиболее сильная у больных с тяжелым НС ($R_s = -0,974$ $p < 0,05$)

Таблица 12

Показатель БТШ-70 в моче и антител к БТШ70 в сыворотке крови у больных ХГН (n=84)

Показатель Группа	Антитела к БТШ-70 (пг/мл)	БТШ-70 (нг/мл)
Здоровые (n=10)	16,4 [15,1;24,6]	0,42 [0,40; 0,43]
I.ХГН с МС (n=34)	28,8 [18,9; 31,1]	0,43 [0,41; 0,45]
II.ХГН с НС (n=30)	21,1 [17,5; 29,7]	0,46 * [0,43; 0,50]
НС с сохранной функцией почек (n=16)	22,7 [17,6;31,36]	0,46 [0,42;2,24]
НС с нарушением функции почек (n=14)	20,3 [15,3; 24,3] *	0,5 [0,41;2,5]
III. Ремиссия ГН (n=10)	17,6 [12,9;23]	0,42 [0,41; 0,43]

* $p < 0,05$

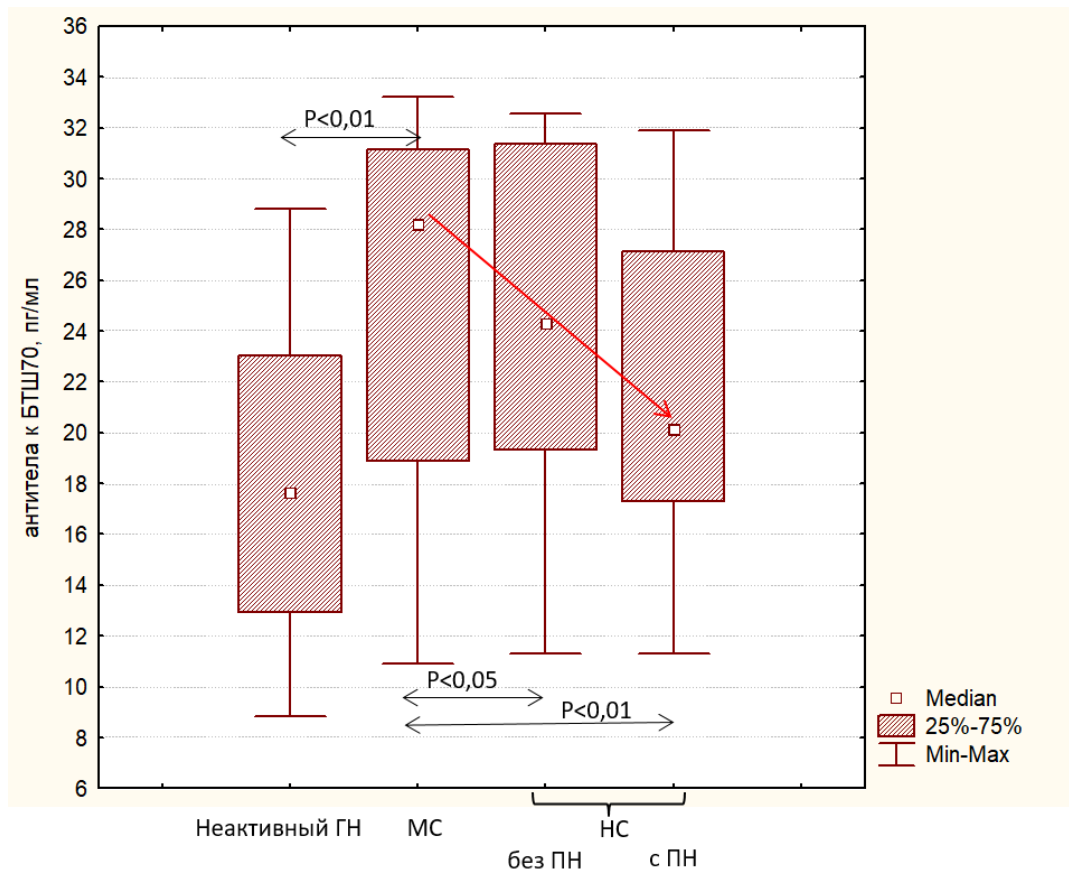


Рисунок 35. Анти-БТШ-70 антитела в сыворотке крови больных ХГН (n=82)

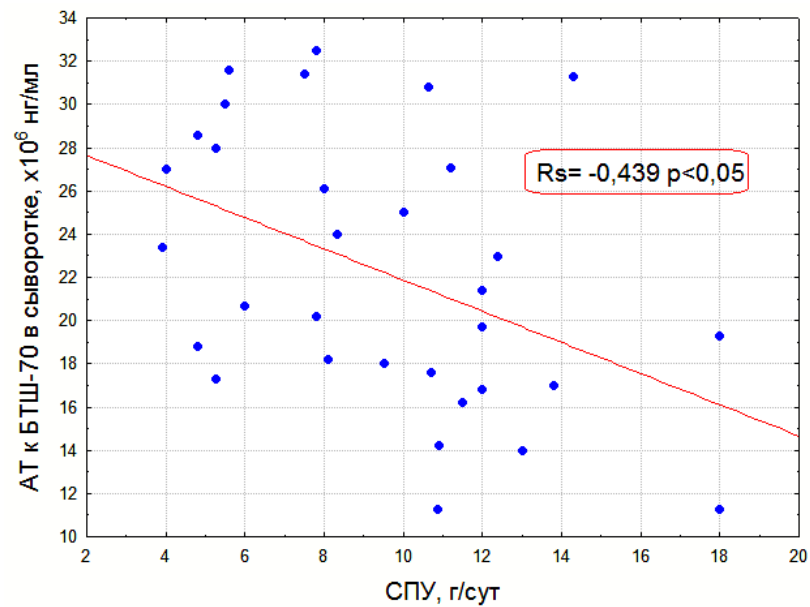


Рисунок 36. Корреляция между показателями анти-БТШ-70-антител и суточной протеинурии у больных ХГН

Резкое уменьшение антител к поверхностным эпитопам БТШ-70 в сыворотке крови выявлялось у больных с активным прогрессирующим течением нефрита, клинически характеризующимся сочетанием выраженного НС с нарушением функции почек (таб. 12 и рис. 35).

3.5.2 Исследование противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-1 α) в моче и Т-регуляторных (противовоспалительных) клеток в биоптатах почечной ткани больных ХГН

Наряду с эффекторной системой повреждения/воспаления ткани почки нами изучено противовоспалительное звено «системы самозащиты почки», а именно экскреция с мочой цитокина ИЛ-1 α - основного антагониста, противодействующего ИЛ-1 β , количество противовоспалительных Т регуляторных клеток в почечной ткани и уровень интерлейкина-10.

ИЛ-1 α является основным антагонистом ИЛ-1, продукция обоих медиаторов происходит одновременно, имеет очень важное значение в разрешении воспалительного процесса в почке [230].

В проведенном исследовании уровень ИЛ-1 α в моче больных с НС (группа II) был выше, чем у больных с меньшей протеинурией (группа I), ремиссией ХГН (группа III) и у здоровых лиц, что отражает активацию его синтеза для ограничения воспалительного процесса в почке (рис. 37). Однако при сочетании НС с нарушением функции почек отмечалось достоверное снижение ИЛ-1 α в моче, что, по-видимому, является следствием нарастающего дисбаланса в противовоспалительной системе в этой группе больных.

Изучен также основной инактиватор лейкоцитов и резидентных клеток в области воспаления – противовоспалительный цитокин ИЛ-10. У здоровых лиц и у пациентов с ремиссией ХГН (группа III) ИЛ-10 в моче практически не обнаруживался (следовые количества). При ХГН с протеинурией от 1 до 3 г/сут (группа I) этот показатель в среднем по группе составлял 0,6 [0,1; 1,1] нг/мл. У больных с нефротическим синдромом (группа II) уровень ИЛ-10 был достоверно ниже, чем у пациентов с меньшей протеинурией, а у больных с НС и нарушением

функции почек определялись следовые количества ИЛ-10 в моче. На рис. 37 представлено распределение уровней ИЛ-10 в моче в различных группах больных. Показано истощение продукции ИЛ-10 у больных с нефротическим синдромом, как результат истощения противовоспалительных механизмов при наиболее активном прогрессирующем течении ХГН

ИЛ-10 продуцируется противовоспалительными клетками CD4+CD25+ (Трег) клетками [34]. Основным регулятором дифференцировки этого фенотипа клеток является транскрипционный фактор forkhead box P3 (FoxP3). Регуляторные Т-лимфоциты подавляют активацию иммунных клеток крови - цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK-клеток, клеток макрофагального ряда, дендритных клеток при непосредственном клеточном контакте, а также путем продукции противовоспалительного ИЛ-10 [105, 180, 204, 234, 270, 295].

Одновременно с изучением уровня анти-БТШ-70 антител в сыворотке крови больных ХГН было оценено количество FoxP3-положительных Т-регуляторных клеток в интерстициальных инфильтратах почки, учитывая непосредственное участие БТШ-70 в активации этого клона Т-лимфоцитов в процессе иммунного воспаления.

Экспрессия FoxP3 обнаружена в отдельных клетках интерстициального инфильтрата, которые были расценены как Т-регуляторные Т-лимфоциты.

Количество экспрессирующих FoxP3 клеток в инфильтрате было меньше у больных с НС (группа II), чем у пациентов с субнефротической протеинурией (группа I), этот показатель коррелировал с уровнем протеинурии, г/сут ($R_s = -0,407$ $p=0,006$). Параллельно количеству FoxP3 клеток у больных II группы снижался и показатель ИЛ-10 в моче. В этой группе отмечался сниженный уровень анти-БТШ70 антител в сыворотке крови (таб. 13 и рис. 38).

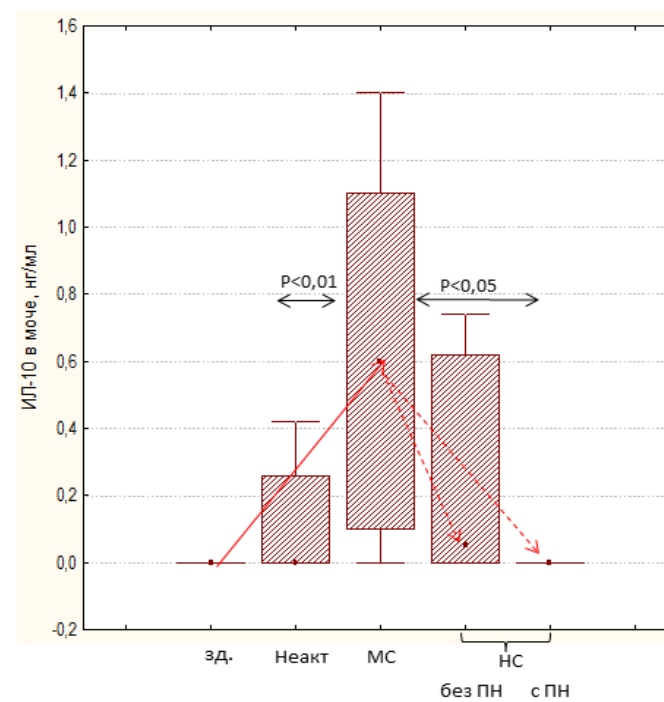
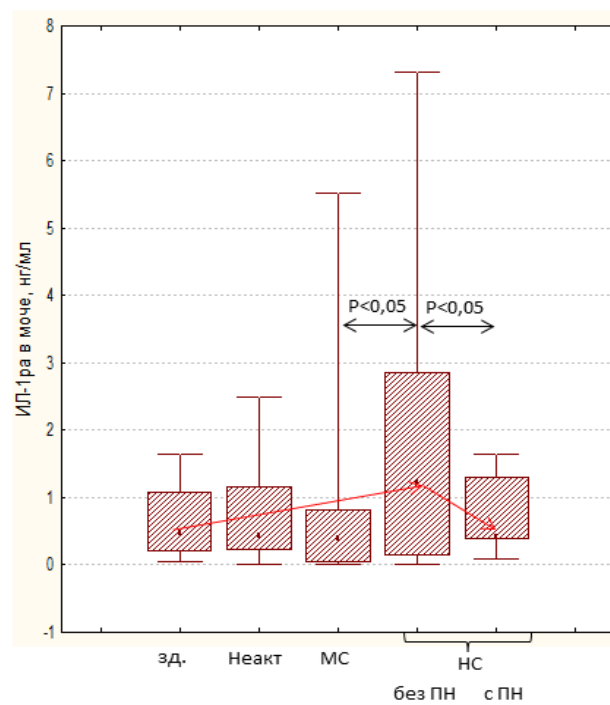


Рисунок 37. Экскреция ИЛ-1ра (n=80) и ИЛ-10 (n=84) с мочой больных ХГН

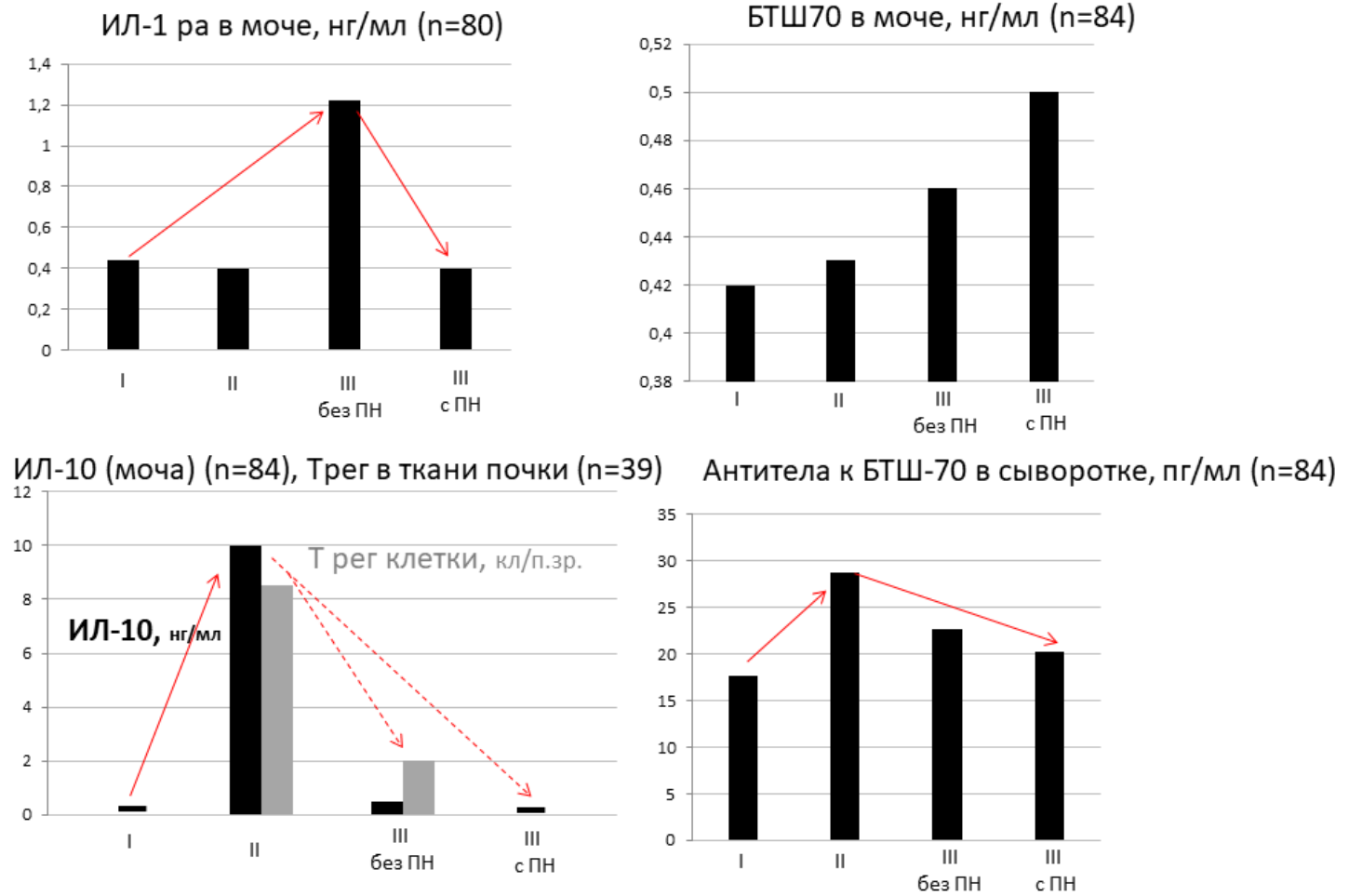


Рисунок 38. Показатели системы самозащиты почки у больных ХГН

Таблица 13

Количество Т-регуляторных (FoxP3-положительных) клеток в ткани почки и показатель ИЛ-10 в моче больных ХГН

Показатель Группа	FoxP3 кл./п.зр.	ИЛ-10, нг/мл
I) MC (n=16)	8,5 [3; 16] **	0,6 [0,1; 1,1]
II) HC (n=23)	2 [0,44; 4]	0 [0;0,05]
HC без ПН (n=18)	1,55 [0,44; 2]	0,05 [0;0,62]
HC с ПН (n=5)	4 [2,2; 4,67]	0 (следы)

** $p < 0,01$ по сравнению с ХГН с HC

3.5.3 Исследование матриксных металлопротеиназ (-2 и -9) и ТИПМ-2 в моче больных ХГН

В последние годы убедительно показано, что система металлопротеиназ и их ингибиторов является важной и неотъемлемой частью процессов воспаления и ремоделирования в клубочках и тубуло-интерстиции почки при ХГН.

В группе больных ХГН с HC (группа II) отмечались достоверно более высокие показатели в моче ММП-2 и ММП-9, чем у больных с протеинурией меньшего уровня (группа I) (таб. 14 и рис. 39)

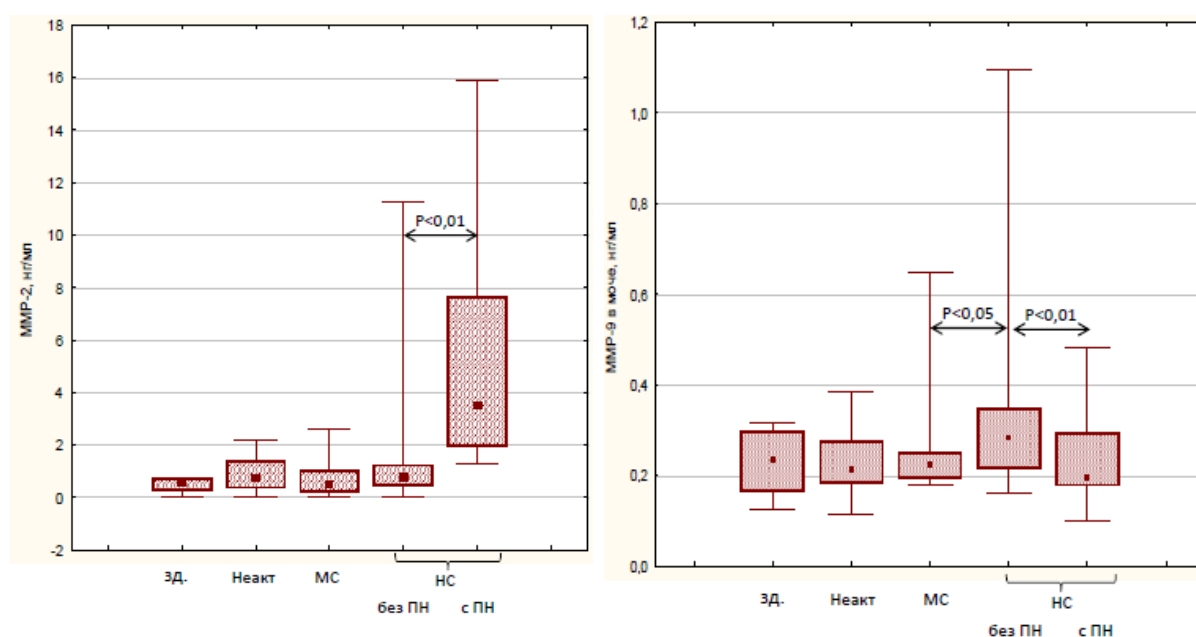


Рисунок 39. Экскреция ММП-2 и ММП-9 с мочой больных ХГН (n=77)

Уровень матричных металлопротеиназ/ТИМП и противовоспалительных цитокинов в моче больных ХГН (n=86)

Группы	ММП-2 (нг/мл)	ММП-9 (нг/мл)	ТИМП-2, нг/мл	ИЛ-10, нг/мл	ИЛ-1-ра, нг/мл
I. с МС n=23	0,52 (0,2;1,024)	0,225 [0,212;0,238]	74,88 * 82,93 – 258,45)	0,1 [0;1,1]	0,4[0,06;0,82]
II. НС n=48	1,024 [0,7; 2,05]	0,268 [0,191;0,312]	202,4 [112;305]	0 [0;0,07]	0,71 [0,16; 2,05]
НС без ПН n=26	0,8 [0,46; 1,25]	0,282 * _□ [0,234; 0,336]	263,27* _□ (140,24– 328,36)	0,05 [0;0,62]	1,22 [0,16;2,85]
с НС и ПН n= 22	3,5* _{□•} [1,93; 7,66]	0,251 [0,221;0,299]	98,30• (52,64- 158,57)	0	0,4 [0,2;1,33]
Здоровые n= 12	0,626 [0,273;0,717]	0,216 (0,165-0,234)	42,54 (29,03- 92,87)	0	0,21 [0,07;0,48]
Ремиссия ГН	0,75 [0,36;1,41]	0,212 (0,182;0,227)	96,9 [38,5; 213]	0 [0;0,25]	0,44 [0,24;1,15]

* p<0,05 по сравнению со здоровыми, □ p<0,05 по сравнению с группой I,

• p<0,05 по сравнению со II группой, ° p<0,05 по сравнению с группой III

У больных ХГН с наиболее тяжелым течением – НС и почечной дисфункцией уровень в моче ММП-2 достоверно повышался, в то время как ММП-9 снижался, у отдельных пациентов - даже ниже уровня здоровых лиц (рис. 39).

Наряду с ММП-2 отмечались более высокие показатели в моче тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы-2 у больных с НС (гр. II), чем у больных с мочевым синдромом (группа I). Однако показатель ТИМП-2 значительно снижался при присоединении к нефротическому синдрому почечной дисфункции (рис. 40).

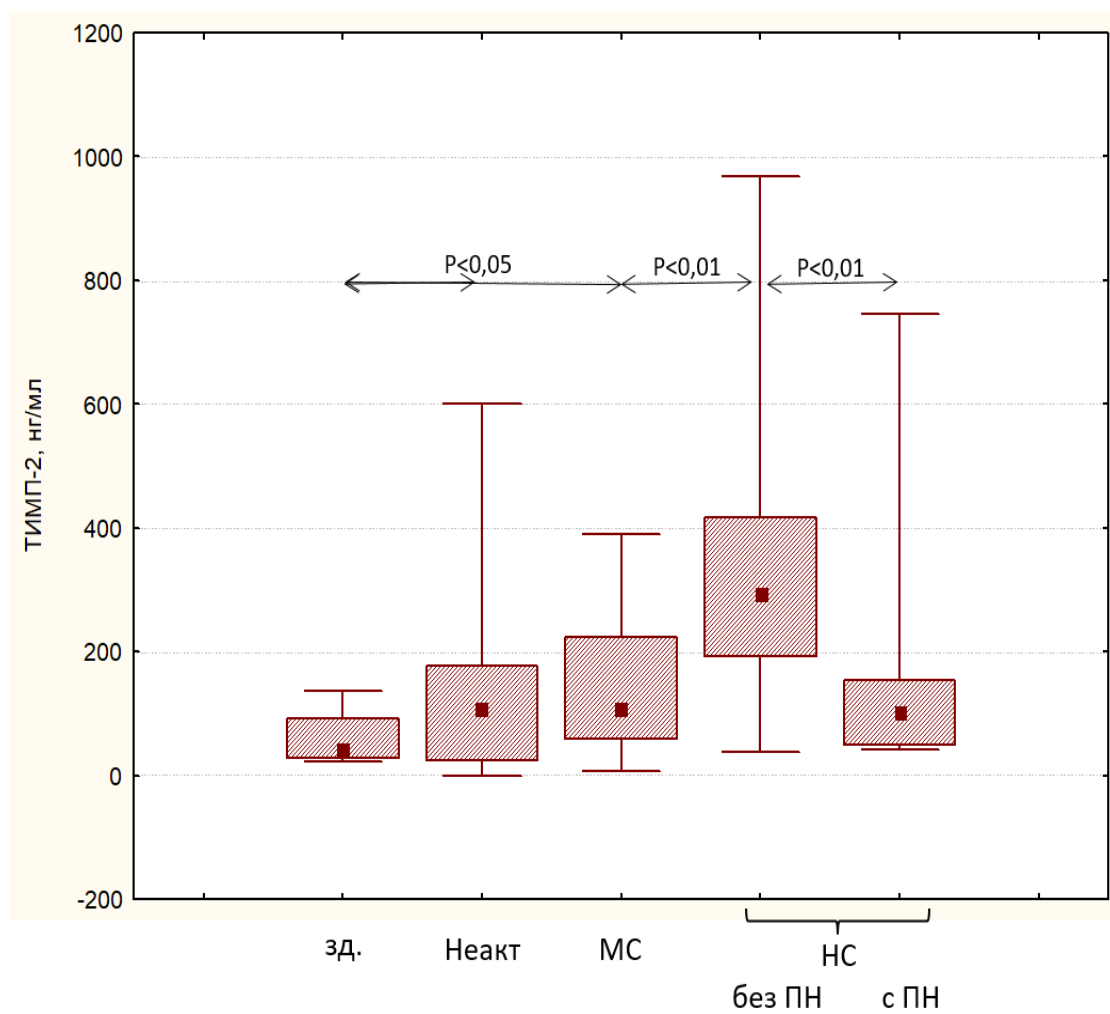


Рисунок 40. Показатель ТИМП-2 в моче больных ХГН (n=79)

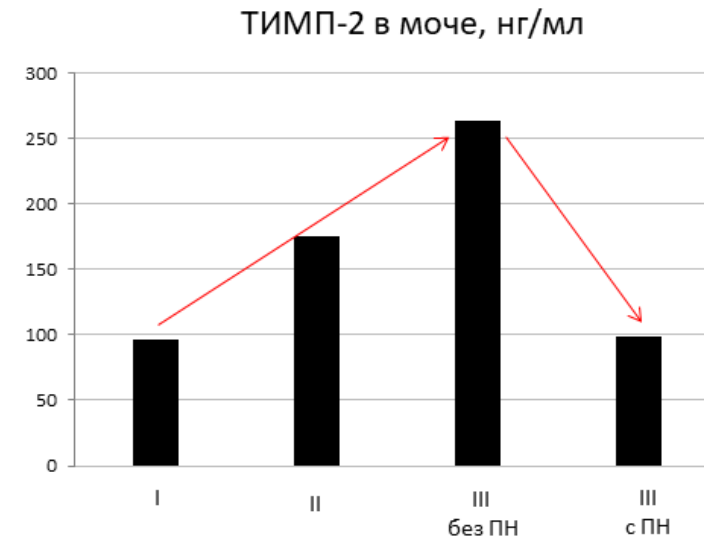
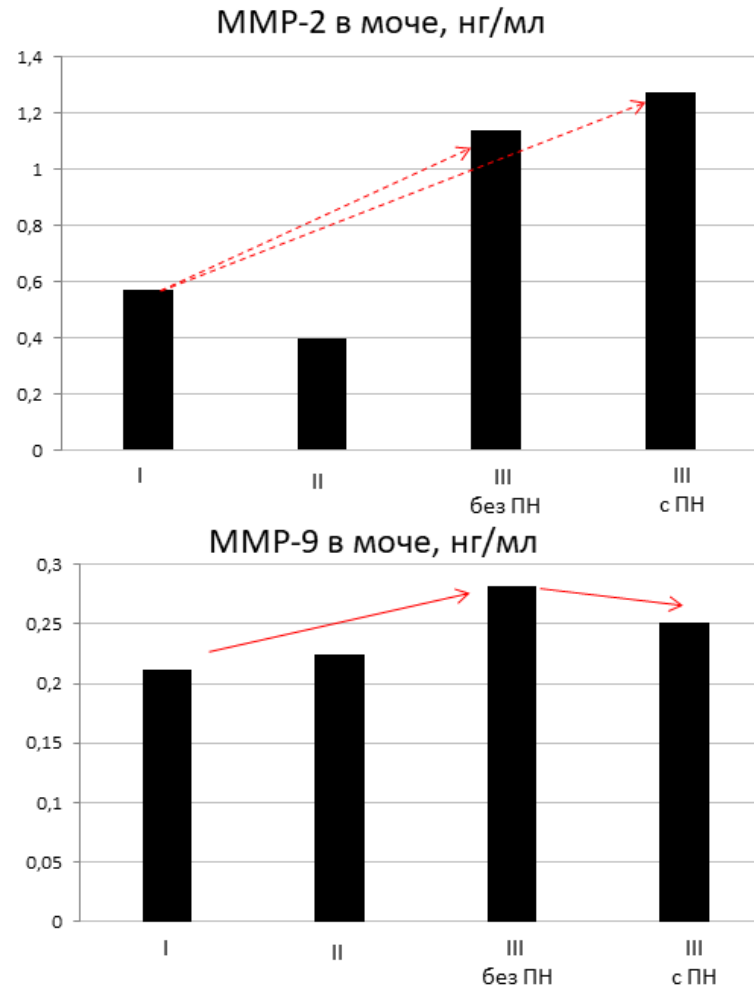


Рисунок 41. Показатели матричных металлопротеиназ/ТИМП в моче больных ХГН (n=77)

Таким образом, у больных с активным течением ХГН имеют место изменения в функционировании системы матриксных металлопротеиназ и ингибиторов. Характер и степень изменения этих факторов зависели от уровня суточной протеинурии и степени нарушения функции почек. Установлено, что при прогрессирующем течении ХГН с почечной дисфункцией нарастает дисбаланс между компонентами системы протеолиза ММП-2 и ТИМП-2 с дальнейшим ростом уровня ММП-2 и значительным снижением его ингибитора - ТИМП-2, что имеет неблагоприятное значение для прогрессирования болезни и клинически проявляется НС и почечной дисфункцией (рис. 41).

3.6 Прогностическое значение исследованных показателей

Полученные результаты изучения факторов повреждения/воспаления и противодействующей им «системе самозащиты почки» при ХГН служат обоснованием определения их значения как критериев прогноза заболевания и ответа на иммуносупрессивную терапию. С целью оценки прогностического значения изученных факторов в отношении ответа на иммуносупрессивную терапию был проведен корреляционный анализ между каждым показателем и ответом на терапию: достоверные корреляции были установлены для показателей нефринурии, подоцитурии, уровня VEGF в моче и антител к белку теплового шока 70 в сыворотке крови (таб. 15).

Наиболее тесная достоверная связь была установлена для показателя нефринурии. У 9 из 11 (82%) больных с низкой (< 17 нг/мл) экскрецией нефрина с мочой ремиссия ХГН была достигнута в течение 6 мес. лечения, причем у 5 больных этой подгруппы НС купирован достаточно быстро - в течение 4 месяцев. У 8 из 12 (67%) больных с высокой нефринурией (> 17 нг/мл) не был получен ответ на, казалось бы, адекватную терапию различными иммуносупрессивными препаратами (включая введение сверхвысоких доз преднизолона и циклофосфана, лечение циклоспорином и микофенолата мофетиллом), проводимую в течение длительного срока от 9 мес. до 2,5 лет (рис. 42).

**Связь мочевых показателей подоцитарной дисфункции и самозащиты почек
с ответом на иммуносупрессивную терапию**

Показатель	Корреляция, р
Антитела к БТШ 70	Rs=0,489, p<0,01
Протеинурия	Rs= - 0,4, p<0,01
Подоцитурия	Rs= - 0,485, p<0,05
Нефринурия	Rs= - 0,93, p<0,01
БТШ 27	Rs= - 0,21, p=0,49
ИЛ-6	Rs= - 0,08, p=0,61
ИЛ-10	Rs=0,19, p=0,28
БТШ 70	Rs= - 0,08, p=0,62
ИЛ-1ра	Rs=0,04, p=0,82
Каспаза-9	Rs = -0,09, p=0,57
VEGF	Rs=0,39, p=0,01
ММР-2	Rs =0,4, p=0,2
ММР-9	Rs = 0,37, p=26

Такая же тенденция была получена и для показателя подоцитурии: купирование нефротического синдрома и достижение ремиссии в течение ближайших 6 мес. наблюдались у больных с меньшими показателями подоцитурии. В то же время у большей части больных (70%) с высокими исходными уровнями подоцитурии НС характеризовался торпидным течением

несмотря на применение тех же схем иммуносупрессивной терапии (включая ПЗ и ЦФА, циклоспорин А, препараты микофеноловой кислоты, ритуксимаб) в течение длительного срока от 9 мес. до 3 лет. (рис. 42)

Для определения информативности показателя нефринурии и подоцитурии в оценке прогноза у больных с НС были построены ROC-кривые. Характер расположения кривой и высокие показатели площади под кривой (для нефринурии $AUC=0,864$, для подоцитурии $AUC=0,846$) свидетельствует о высокой информативности изученных показателей в прогнозировании ответа на иммуносупрессивную терапию в течение 6 мес., который заключается в уменьшении протеинурии и купировании НС, и следовательно, более благоприятным течением заболевания (рис. 43, 44). Кроме того, показатели нефринурии и подоцитурии обладают более высокой информативностью в отношении ответа на иммуносупрессивную терапию по сравнению с другими общепризнанными факторами прогноза (уровнем протеинурии и креатинина сыворотки крови) (рис. 45, 46). Относительный риск резистентности к проводимой терапии для показателя подоцитурии был в 5 раз выше.

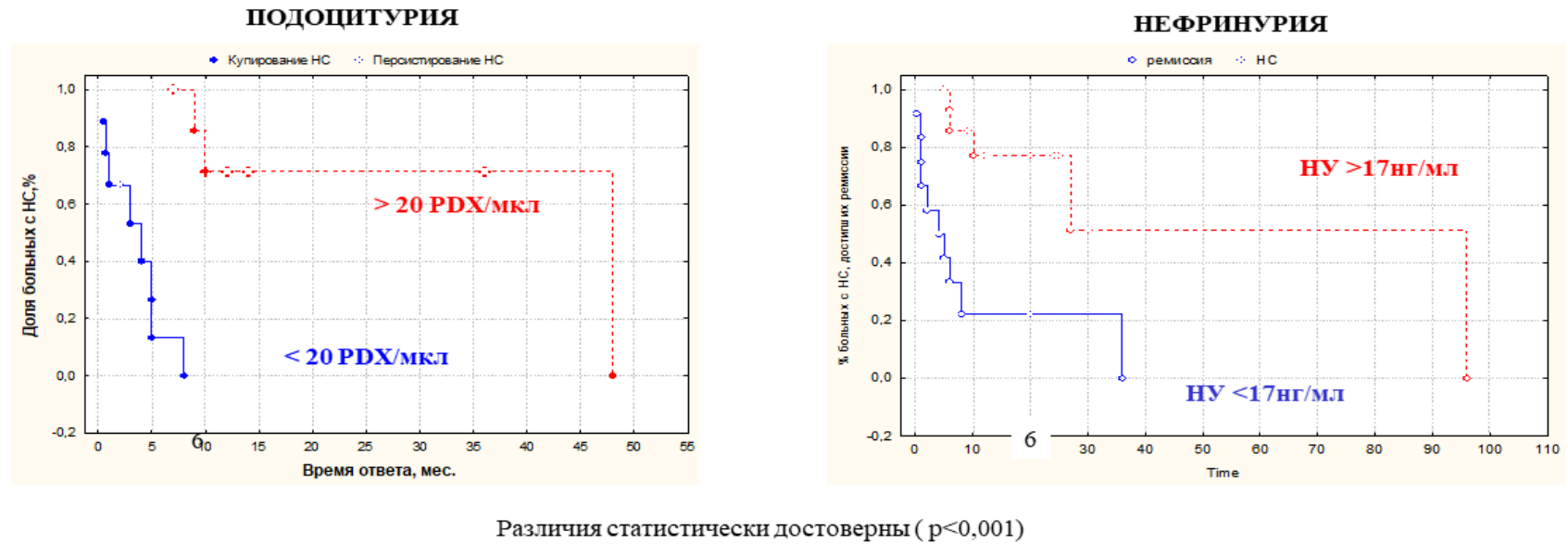


Рисунок 42. Исходные уровни подоцитарных маркеров у больных ХГН с различным ответом на иммуносупрессивную терапию (n=55)

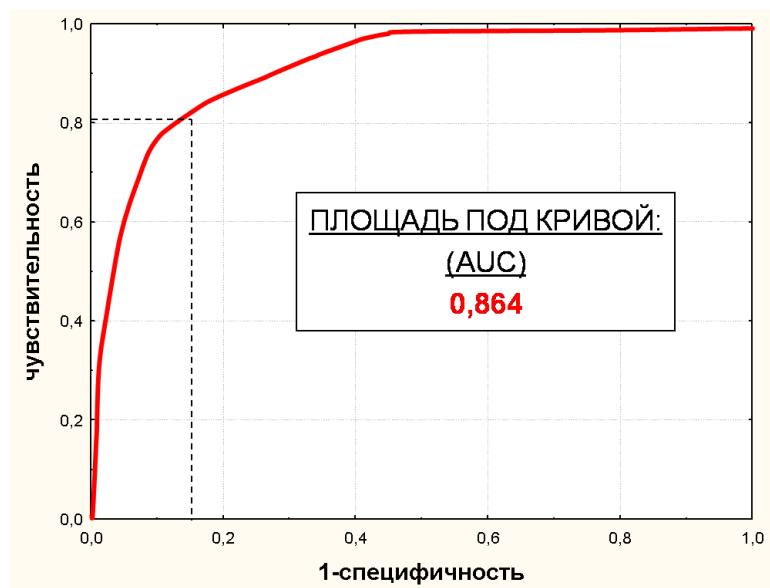


Рисунок 43. ROC-кривая информативности метода оценки нефринурии для прогнозирования ответа на иммуносупрессивную терапию у больных ХГН с НС

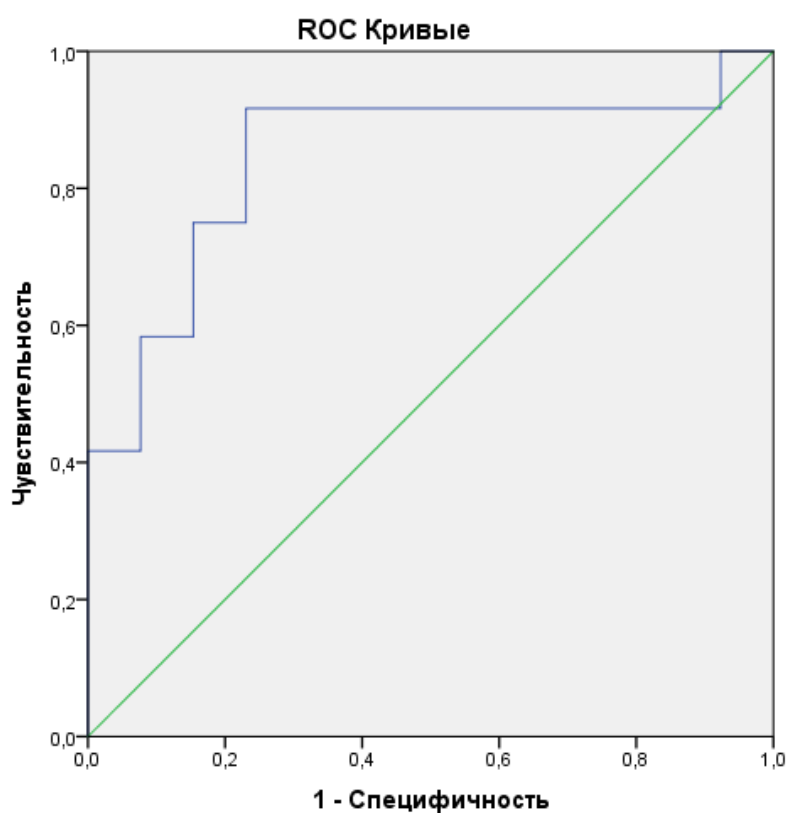


Рисунок 44. ROC-кривая для оценки подоцитурии в прогнозировании ответа на терапию (AUC= 0,846)

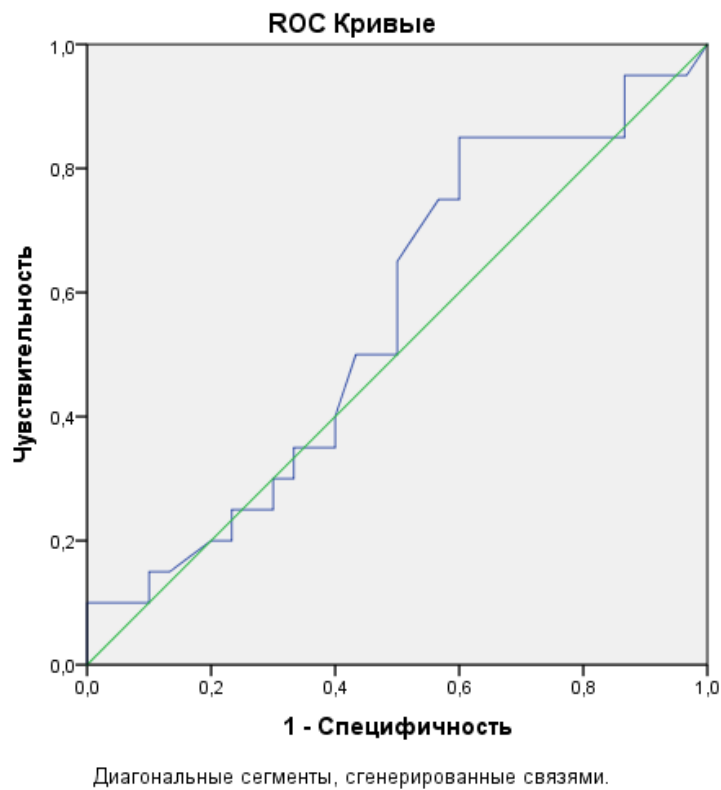


Рисунок 45. ROC-кривая для оценки протеинурии в прогнозировании ответа на терапию (AUC= 0,624)

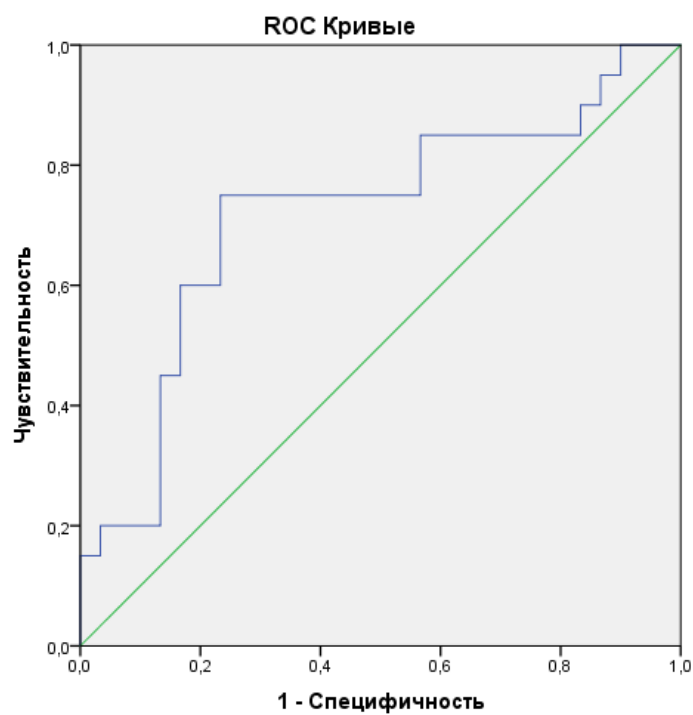


Рисунок 46. ROC-кривая для оценки креатинина сыворотки крови в прогнозировании ответа на терапию (AUC= 0,718)

Наряду с нарастанием уровня маркеров подоцитарного повреждения дополнительное неблагоприятное прогностическое значение в оценке эффективности проводимой терапии имело снижение в моче другого подоцитарного фактора - VEGF. Ремиссия ХГН преимущественно в течение первых 6 мес. активной терапии, достигнута у 14 из 18 (77,8%) больных с НС и уровнем VEGF в моче более 124 нг/мл, в то время как у больных с низкими показателями VEGF в моче лишь у 8 из 20 (40%) купирован НС, у 12 НС персистировал от 6 мес. до 2-х лет, несмотря на проводимую терапию (рис. 47). При построении ROC-кривой AUC для показателя VEGF в моче составил 0,679 (рис. 48).

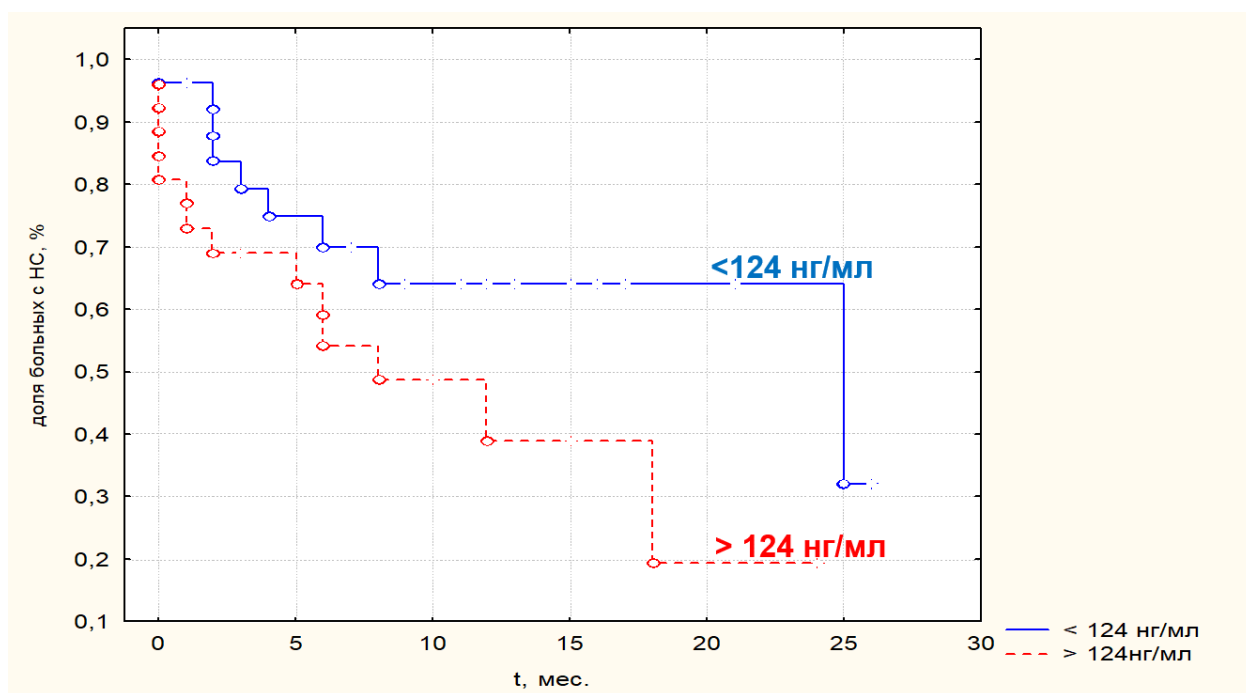


Рисунок 47. Исходный уровень VEGF в моче у больных с различным ответом на иммуносупрессивную терапию

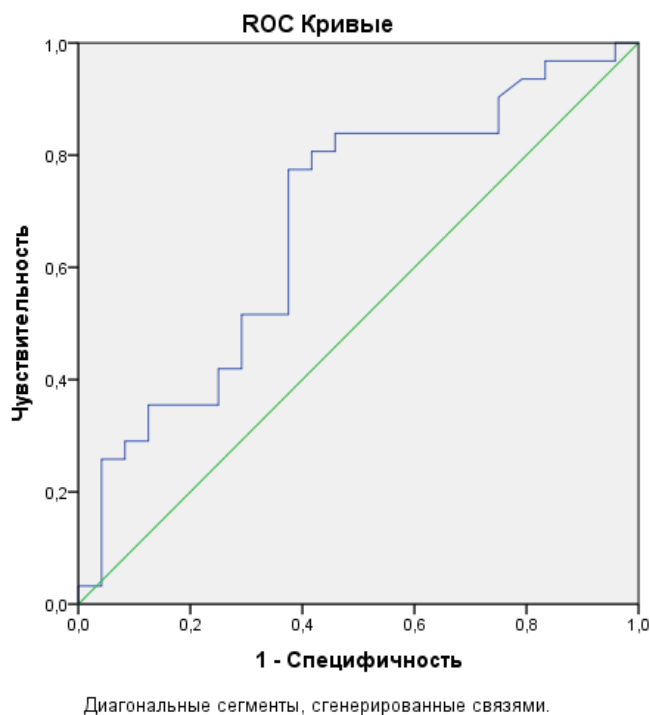


Рисунок 48. ROC-кривая для оценки VEGF в моче в прогнозировании ответа на терапию (AUC= 0,679)

Среди показателей самозащиты почки прогностическое значение при ХГН имел уровень анти- БТШ-70-антител. У больных с уровнем анти-БТШ70 антител в сыворотке крови более 21пг/мл ответ на иммуносупрессивную терапию (купирование НС или уменьшение протеинурии менее 1г/сут) наступал в течение года (рис. 49). В течение 6 мес. лечения ремиссия была достигнута у 8 из 16 (50%). У большинства - 13 из 16 (81,25%) ответ был получен в течение года, у оставшихся 3 из 16 ремиссия была достигнута позже в срок до 20 мес. (рис. 50).

Напротив, у 12 из 21 (57,1%) пациентов с низкими титрами анти-БТШ-70-антител (ниже 21 пг/мл) ремиссии достичь не удалось в течение 15-20 мес. лечения, несмотря на применение адекватных схем лечения, рекомендованных для данных форм заболевания, и последовательное чередование различных схем иммуносупрессивной терапии (введение стероидов, в том числе в сверхвысоких дозах, сочетание с ЦФА, применение циклоспорина А, препаратов микофенолата мофетила и азатиоприна). При построении ROC-кривой площадь под кривой составила 0,613 (рис. 51).

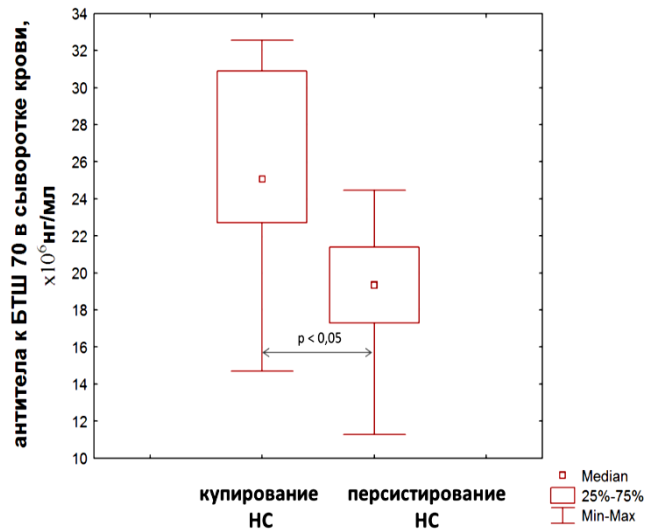


Рисунок 49. Характер течения нефротического синдрома у больных с НС в зависимости от исходного уровня анти-БТШ-70 антител в сыворотке крови (n=25)

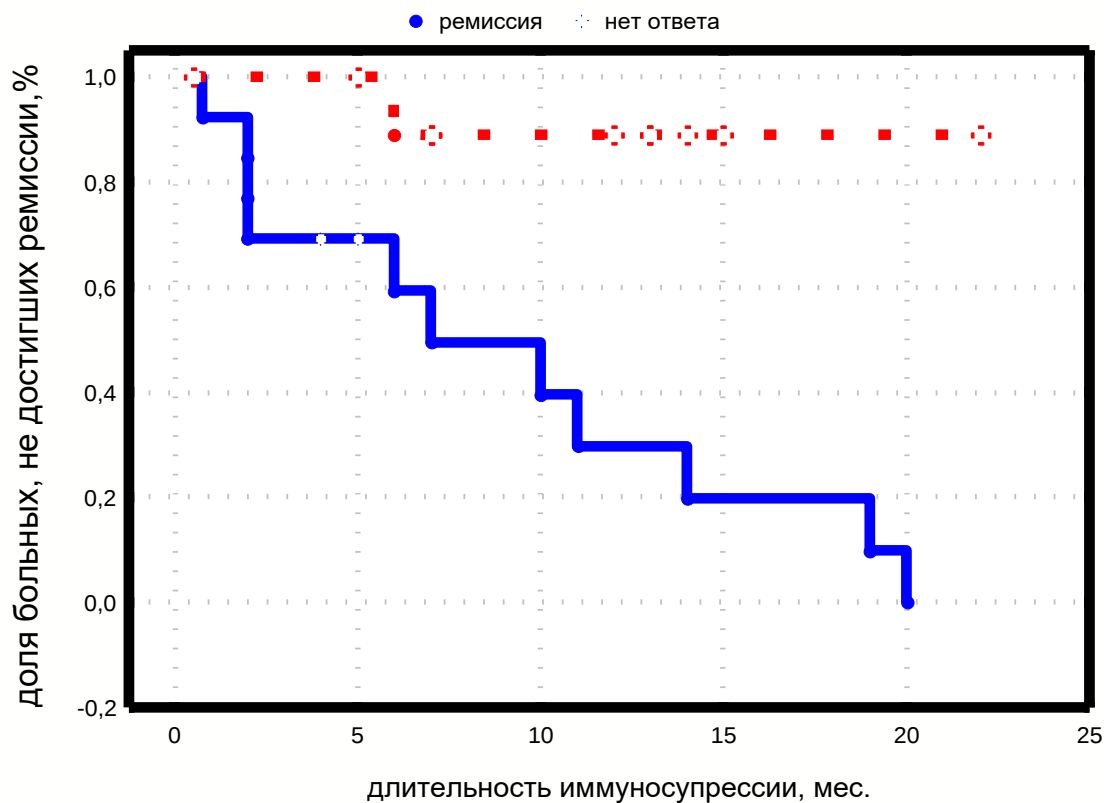


Рисунок 50. Частота ремиссий при проведении иммуносупрессивной терапии у больных ХГН в зависимости от исходного уровня анти-БТШ-70 антител в сыворотке крови (n=37)

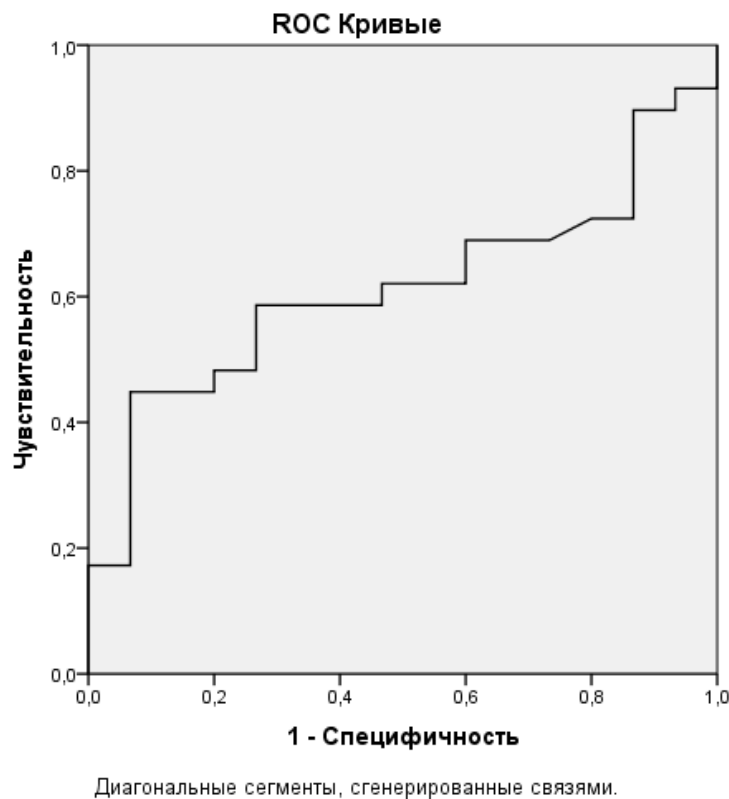


Рисунок 51. ROC-кривая для оценки уровня антител к БТШ70 в прогнозировании ответа на терапию (AUC =0,613)

3.7 Результаты применения препарата, блокирующего эффекты моноцитарного хемотаксического протеина-1 (пептид X MCP-1 65-76)

Дополнительным аргументом в пользу важной роли провоспалительного хемокина MCP-1 в развитии подоцитарного повреждения и протеинурии является антипротеинурический эффект при таргетном воздействии малых молекул, блокирующих эффекты MCP-1. Так, в экспериментальных исследованиях на моделях острого воспаления у лабораторных животных, помимо активации процесса миграции в очаг воспаления гранулоцитов и моноцитов, были получены данные о возможном непосредственном воздействии MCP-1 на подоцит и антипротеинурическом эффекте ингибиторов MCP-1 [321, 325]. Кроме того, у больных с нефритом отмечен антипротеинурический и ренопротективный эффект ингибиторов MCP-1 за счет прямого влияния на подоциты [53, 299]. В настоящем исследовании впервые проведена оценка эффективности введения конкурентного

антагониста МСР-1 - пептида X (МСР-1 65-76) у больных с протеинурическими формами ХГН.

Лечение проводилось у 7 больных хроническим гломерулонефритом с различными морфологическими вариантами нефрита (МН, МПГН, МКГН, ФСГС): у 4-х больных с выраженным мочевым синдромом, у 3 больных с умеренным нефротическим синдромом.

Препарат вводили больным ХГН парентерально в течение недели (схема введения подробно изложена в главе «Материалы и методы», рис. 6). У 6-ти больных проведено 3 полных курса введения препарата (по 1 неделе ежемесячно), один пациент после первого курса досрочно выбыл из исследования в связи с нарастанием тяжести НС и необходимости усиления иммуносупрессивной терапии.

На 7 сутки после курса введения МСР-1 пептида (65-76) у 6 из 7 больных отмечено достоверное уменьшение ПУ в среднем до 1,28 [0,32;1,64 г/сут], что составило 61 % от исходного уровня (3,29 [1,97;5,75] г/сут, $p<0,05$). Антипротеинурический эффект сохранялся на 14 сутки - показатели протеинурии составляли 1,37 [0,96; 2,13] г/сут, и на 21 сутки – ПУ в среднем 1,81 [1,1;2,2]г/сут, только через месяц после введения показатели протеинурии достигли исходного уровня 2,58 [0,78; 3,3] г/сут (рис. 52).

У одного пациента с нефротическим синдромом на 7 сутки после введения пептида отмечалось нарастание ПУ с 5,28 до 16 г/сут, в связи с чем начата стандартная иммуносупрессивная терапия преднизолоном и циклофосфамидом.

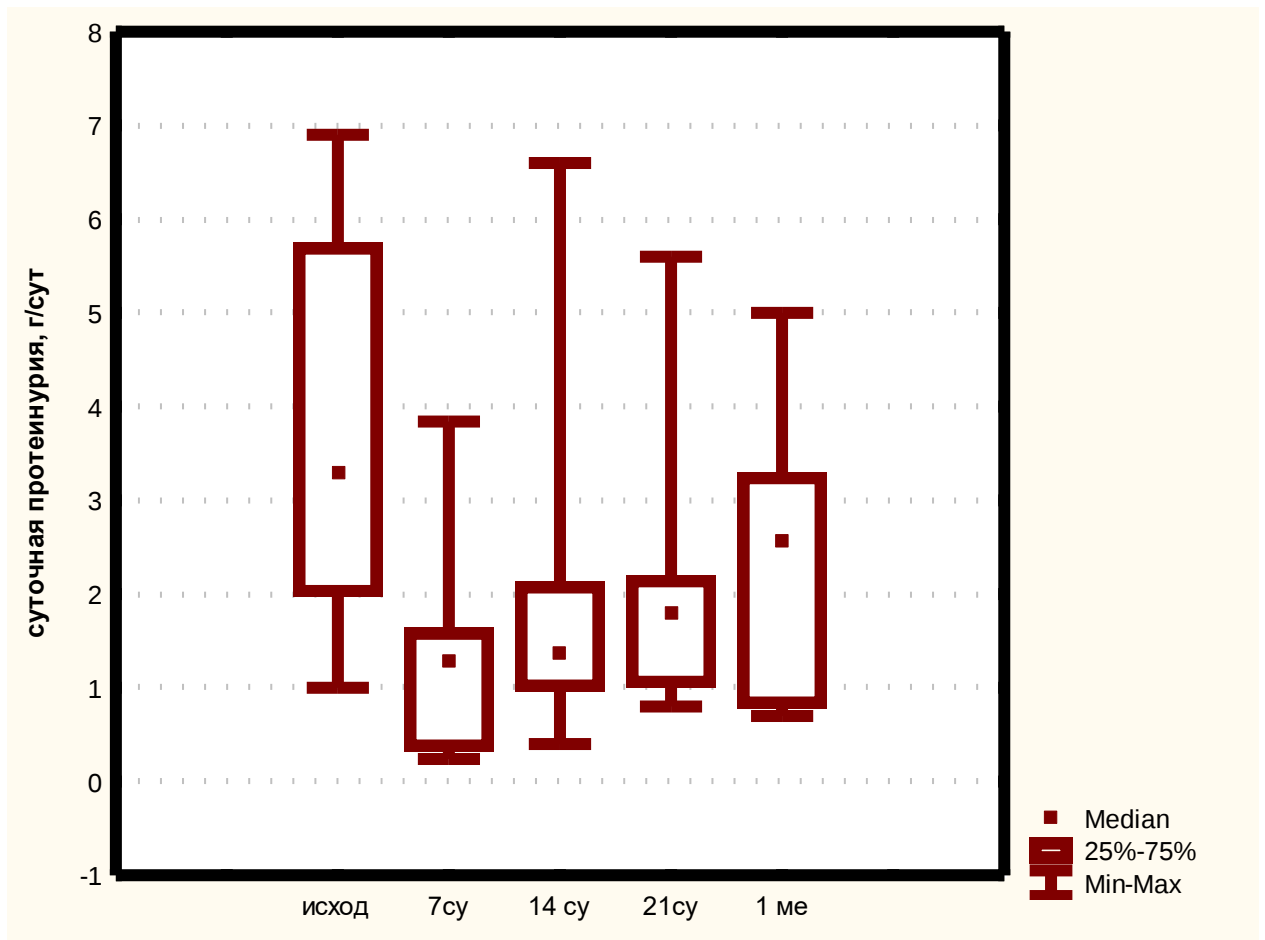


Рисунок 52. Динамика суточной протеинурии у больных ХГН при введении МСР-1 пептида ($p < 0,05$ для показателя СПУ на 7 и 14 сут.)

После повторных введений пептида МСР-1 (второго и третьего курсов) у 6 пациентов, которым было продолжено лечение, отмечалась отчетливая положительная динамика показателей протеинурии (рис. 53).

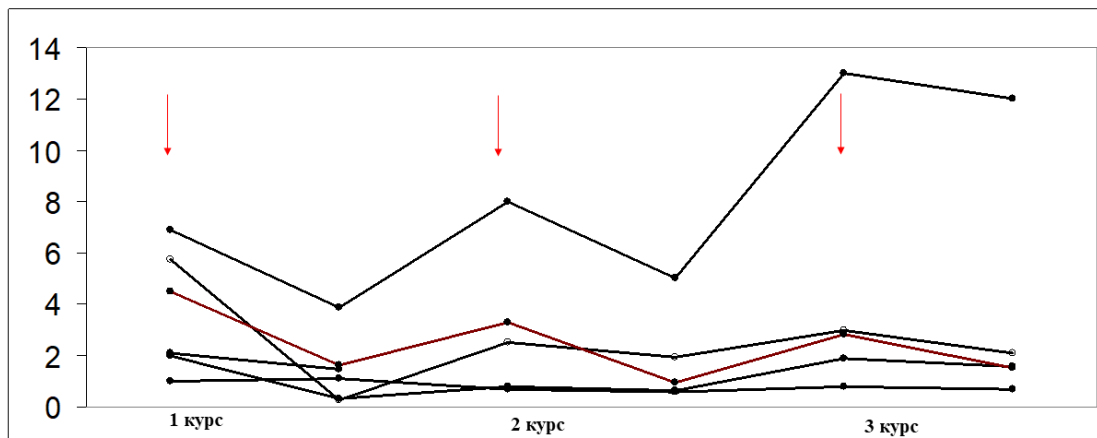


Рисунок 53. Динамика суточной протеинурии у 6 больных ХГН при проведении повторных курсов лечения

Таким образом, у большинства пролеченных больных хроническим гломерулонефритом с выраженной протеинурией и нефротическим синдромом в результате блокады эндогенного MCP-1 антипротеинурический эффект развивался в течение первых 7 суток и сохранялся в течение 3 недель после введения. Быстрое достижение антипротеинурического эффекта, помимо подавления миграции клеток воспаления в клубочках почек, по-видимому, связано с непосредственным влиянием на подоциты – ключевое звено развития ПУ при ХГН. В исследовании Lee E.Y. и соавт. было показано, что добавление MCP-1 в культуру подоцитов приводило к изменению миграционных свойств (подвижности) этих клеток путем реорганизации цитоскелета с перемещением актиновых филаментов к периферии [169]. Такие изменения цитоскелета подоцита осуществлялись после активации рецепторов CCR2, экспрессирующихся на поверхности этих клеток [299].

Антагонисты MCP-1 и CCR2 блокируют изменения цитоскелета подоцитов и повышение проницаемости подоцитарного монослоя для альбумина, что лежит в основе их антипротеинурического действия [299]. Так, в исследовании по

применению ингибитора МСР-1 у больных активным волчаночным нефритом (Ble А. и соавт.) введение препарата привело к стойкому антипротеинурическому эффекту, сохранявшемуся в течение 6 месяцев у 6 из 11 больных [50]. Однако механизмы воздействия пептида МСР-1(65-76) на подоциты требуют дальнейшего изучения.

Помимо оценки динамики протеинурии во время первого курса лечения изучен уровень МСР-1 в моче больных ХГН. У всех больных независимо от получения антипротеинурического эффекта отмечено повышение уровня МСР-1 в моче на 7 сутки после введения препарата, в дальнейшем стабильно более высокий его уровень сохранялся в течение месяца (рис. 54).

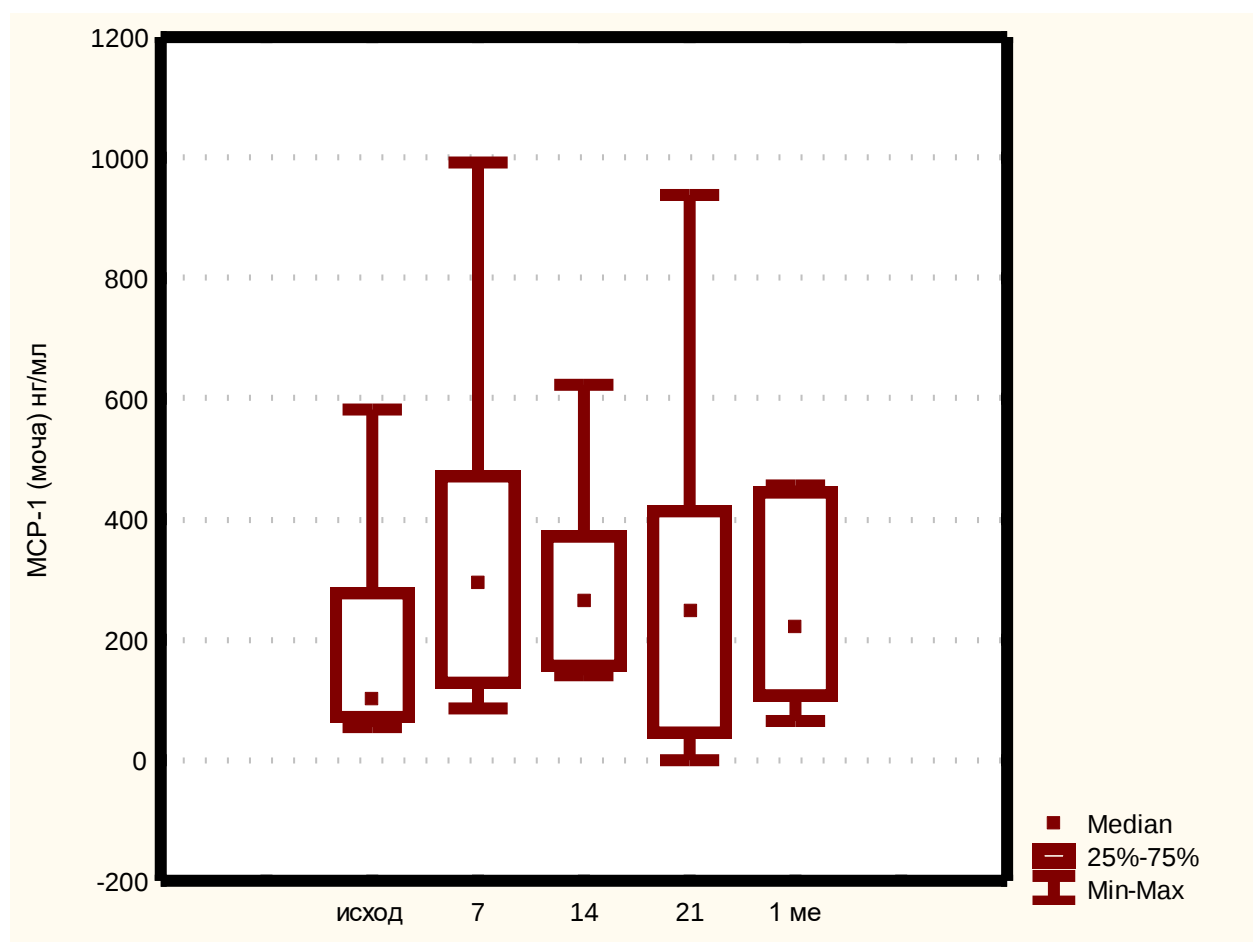


Рисунок 54. Динамика мочевого показателя МСР-1 у обследованных больных ХГН после введения пептида МСР-1(65-76)

Учитывая быстрое разрушение пептида МСР-1 (65-76) в крови (через 24 ч), возможным объяснением такой динамики МСР-1 является его дополнительная повышенная эндогенная секреция после завершения введения препарата и прекращения блокирующего эффекта препарата.

Тем не менее, учитывая достаточно выраженное снижение протеинурии, полученные результаты обосновывают перспективу таргетной терапии, направленной на блокирование эффектов провоспалительных цитокинов, воздействующих на подоцит.

3.8 Клинические примеры

Клинический пример N1.

Больной М., 45 лет.

В течение 10 лет в анализах мочи наблюдались следы белка; последние 2 года отмечается появление артериальной гипертензии с повышением АД 150/100 мм рт. ст. С 05.2006г. – появились отеки стоп; при обследовании выявлен нефротический синдром (суточная протеинурия – 6,8г/сут, общий белок - 35г/л, альбумин – 20г/л), функция почек сохранна (креатинин 105мкмоль/л). Проводилось лечение антигипертензивными и мочегонными препаратами. Поступил в клинику для проведения биопсии почки и определения тактики ведения.

При поступлении: состояние средней тяжести. Кожные покровы нормальной окраски, чистые. Выраженные отеки нижних конечностей. АД 160/100 мм рт. ст., ЧСС=Ps=80 уд. в мин. Дизурии, никтурии нет.

Общий ан. мочи: протеинурия составляла 9,6-6,6г/л, эритроциты -5-7 в п.зр. Суточная протеинурия (СПУ) – 12-8,45 г.

Общий белок сыворотки крови – 33-29,6 г/л, альбумин – 16 г/л, креатинин - 1,2мг/дл. Натрий – 144-139мэкв/л, калий 2,9-2,8 мэкв/л.

Проба Реберга: СКФ –138 мл/мин.

Иммунология: РФ – отр., комплемент – 28,6, криоглобулины – отр., ANA-отр., антитела к ДНК – отр.

Коагулограмма: АЧТВ – 0,96 (0,75-1,25), ПИ – 89% (86-110), фибриноген – 4,87 г/л (1,8-4,0).

УЗИ почек: Почки обычно расположены, контуры неровные, нормальных размеров, толщина паренхимы – 20-21мм. Паренхима почек повышенной эхогенности.

Биопсия почки: Биоптат почки представлен корковым слоем (до 7 клубочков), 2 клубочка склерозированы. В клубочках отмечается диффузное утолщение БМК, незначительная очаговая пролиферация мезангиоцитов, очаговое расширение мезангия, склероз отдельных сосудистых петель. Эпителий извитых канальцев в состоянии белковой дистрофии. Очаговый склероз стромы. Артериолосклероз. Очагово-распространенные лимфогистиоцитарные инфильтраты. При иммуногистохимическом исследовании вдоль ГБМ выявлены отложения IgG и C3 линейного характера. Амилоида не найдено. Заключение: морфология мембранозной нефропатии.

Учитывая морфологический вариант нефрита (мембранозная нефропатия), проведен онкопоиск с целью исключения паранеопластической природы поражения почек. Данных за опухоль не получено.

До биопсии почки произведен забор мочи для исследования.

В моче выявлены высокие уровни нефрина - 37,5нг/мл (у здоровых – 7,9[1,7;9,5]), подоцитурии 38,36 pdx+/мкл (у здоровых 0[0;0,6]), каспазы-9 до 33.7нг/мл (у здоровых 31[31,2;31,6]) и невысокий уровень VEGF (130 пг/мл). (у здоровых -62,2[54;73,5]). В клубочках биоптата почки отмечено снижение экспрессии WT-1 – подоцитопения до 20кл/п.зр.

В течение 6 мес. проводилась иммуносупрессивная терапия метипредом (МП) 48-16 мг в сутки per os и сочетанными «пульсами» МП (суммарно 18000мг) и циклофосфамида (ЦФА) (суммарно 5600мг) без эффекта – сохраняются отеки, нефротический синдром (СПУ до 7,04г/сут).

Комментарий: *Представленное наблюдение иллюстрирует информативность маркеров повреждения подоцитов (подоцитурии, нефринурии*

и VEGF, а также экспрессии WT-1) в отношении прогноза эффективности иммуносупрессивной терапии. Сочетание высокого уровня подоцитарных маркеров со снижением фактора выживаемости VEGF указывает на дисбаланс в системе повреждения/«самозащиты» почки с развитием подоцитопении, что клинически проявляется тяжелым НС, не ответившим в течение 6 мес. на своевременно начатую адекватную иммуносупрессивную терапию. Дополнительным аргументом в пользу неблагоприятного прогноза служит уменьшение экспрессии WT-1, подтверждающее развитие подоцитопении.

Клинический пример N2.

Больная Р., 36 лет.

С мая 2009г. появилась артериальная гипертензия с повышением АД до 150/100 мм рт.ст., принимала антигипертензивные препараты (ингибиторы АПФ), несколько месяцев спустя появились отеки голеней (до верхней трети). При обследовании выявлен нефротический синдром: СПУ до 3,92г/сут., общий белок – 38,3г/л, альбумин – 15,8г/л, функция почек сохранна (креатинин сыворотки крови в пределах нормы – 95-88 мкмоль/л).

При поступлении: состояние средней тяжести. Кожные покровы нормальной окраски, чистые. Выраженные отеки голеней. АД 120/80 мм рт. ст., ЧСС=Ps=60 уд. в мин. Дизурии, никтурии нет.

При обследовании в ан. мочи: белок -12,96 г/л, эритроциты – 0-3; 1-2 в п/зр., лейкоциты – 1-3 в п/зр.

Суточная протеинурия – 5,51-10 г/сут

Биохим. ан. крови: общий белок – 43-51-52г/л, альбумин – 23-24-26 г/л, креатинин – 0,93 мг/дл. Натрий – 141-123мэкв/л, калий 4,6-4,8 мэкв/л, липиды крови: триглицериды – 3,23-1,74ммоль/л (0,57-2,28), общий холестерин –14,55-7,87 (3,88-6,47) ммоль/л, ЛОНП– 0,6-0,3 (0,114-0,342) ммоль/л.

Проба Реберга: СКФ – 108 мл/мин.

Комплемент – 31,2.

Коагулограмма: АЧТВ – 1,11 (0,75-1,25), ПИ – 110% (86-110), фибриноген – 7,10г/л (1,8-4,0).

УЗИ почек: Почки обычно расположены, контуры ровные, нормальных размеров, паренхима – 17-18мм. ЧЛС не расширена. Подвижность почек при дыхании обычная. При ЦДК кровоток не изменен, прослеживается до периферических отделов.

Биопсия почки: Биоптат почки представлен корковым слоем (до 14 клубочков), 2 клубочка полностью склерозированы. В 2 клубочках определяются участки очагового расширения и гиалиноза/склероза мезангия в области рукоятки, очаговые утолщения БМК, расширение и склероз мезангия, склероз сосудистых петель, единичные синехии. В остальных клубочках минимальные изменения, полнокровие. Эпителий извитых канальцев в состоянии белковой дистрофии и очаговой субатрофии, очаговый склероз и очаговая лимфо-гистиоцитарная инфильтрация стромы. Артериолосклероз. При ИГ исследовании обнаружена фиксация IgG, А, М и С3 и фибриногена на ГБМ очагового гранулярного характера. Амилоида не найдено. Заключение: морфология фокального сегментарного гломерулярного гиалиноза.

Забор мочи для исследования произведен до проведения биопсии почки. Выявлен невысокий уровень нефрина в моче - 14,4 нг/мл (у здоровых – 7,9[1,7;9,5]), подоцитурии – 8 рdx+/мкл (у здоровых 0[0;0,6]), экспрессия WT-1, отражающая степень подоцитопении, составила 26,5кл/п.зр., что составило приблизительно 60% от контроля 44[38;47].

С учетом морфологического варианта нефрита, была назначена терапия циклоспорином 150 мг/сут, метипредом 24мг per os. Через 2 мес. терапии достигнута ремиссия нефротического синдрома - суточная протеинурия

составила 1,1 г/сут, общий белок – 60 г/л, альбумин – 34г/л, функция почек сохранна (креатинин 1,1-1,06мг/дл).

Комментарий: На основании клинических особенностей (длительно персистирующий нефротический синдром), неблагоприятного морфологического варианта ХГН (ФСГС) с признаками формирующегося интерстициального фиброза, у данной пациентки можно было предполагать прогрессирующее течение ХГН и высокую вероятность отсутствия ответа на проводимую терапию. Однако уже в начале лечения уменьшилась протеинурия, увеличился уровень общего белка и альбумина сыворотки, а в течение 2-х месяцев была достигнута полная ремиссия заболевания. Этот ответ соответствует невысокому уровню нефринурии (<17нг/мл), подоцитурии (<21 pdx+/мкл), отсутствию тяжелой подоцитопении (40% потери подоцитов от исходной), что отражает умеренную подоцитарную дисфункцию и обратимость нарушений фильтрационного барьера при своевременном проведении иммуносупрессии.

Следует отметить, что в первом и втором примерах отмечались тяжелый нефротический синдром, высокая протеинурия и сохранная функция почек, то есть клинические признаки активности заболевания были схожими, однако эффект иммуносупрессивной терапии различался: в первом случае не удалось достигнуть быстрого эффекта при проведении адекватной иммуносупрессивной терапии, учитывая тяжелую подоцитарную дисфункцию и подоцитопению, во втором случае эффект терапии наступил быстро, изменения исследуемых показателей были умеренные, что еще раз подтверждает их важное значение в определении прогноза иммуносупрессивной терапии.

В обоих представленных наблюдениях имеет место тяжелый НС с массивной протеинурией и сохранной функцией почек. Результаты биопсии почки (МН – в первом случае, ФСГС – во втором) давали больше основание надеяться на эффективность иммуносупрессивной терапии именно у первого пациента,

чего, однако, не произошло. Результаты мочевых тестов и морфологического исследования ткани почки на WT-1 в обоих наблюдениях позволяют объяснить это с позиций выраженности подоцитарной дисфункции, показатели которой оказались худшими у пациента с мембранозной неропатией, что и обеспечило отсутствие ответа на иммуносупрессивную терапию. У второй пациентки, несмотря на морфологическую картину ФСГС – менее благоприятного морфологического варианта Ю отмечен быстрый ответ на терапию, что подтверждает несомненную целесообразность использования исследованных маркеров в клинической практике для прогноза терапии.

Клинический пример N3.

Больная М., 23 лет, находилась в нефрологическом отделении клиники с диагнозом: Хронический гломерулонефрит нефротического типа (морфологически - мезангиопролиферативный вариант) с сохранной функцией почек.

Из анамнеза. С января 2006г. после кишечной инфекции и приема иммуномодуляторов появились отеки голеней. При обследовании выявлен НС (СПУ составляла 2,6-3,5г/сут., общ. белок – 4,9-5,1 г/дл, альбумин 2,8-3,1 г/дл, ХС – 319мг/дл), креатинин 1,0-0,9мг/дл, СКФ – 66-104мл/мин. Проводилась терапия ингибиторами АПФ, статинами. Госпитализирована в клинику для проведения биопсии почки и выработки тактики ведения.

При поступлении состояние удовлетворительное. Кожные покровы чистые. Небольшие отеки стоп. АД 140/80 мм рт. ст., ЧСС=Ps=70 уд. в мин. В ан. мочи: Белок -7,55г/л, эритроциты – 3-6 в п/зр., лейкоциты – 3-5 в п/зр. Суточная протеинурия – 3,9 г

Биохим. Ан. крови: общий белок – 48 г/л, альбумин – 29 г/л, креатинин – 0,9 мг/дл. Натрий – 142мэкв/л, калий 4,2 мэкв/л.

Проба Реберга: СКФ – 81 мл/мин.

Иммунология: РФ – отр., комплемент – 34,9 г/л, СРБ – отр.

УЗИ почек: Правая почка опущена на 7см, размеры: правая – 115х50 мм, толщина паренхимы 18 мм, левая 123х48мм, толщина паренхимы – 17 мм,.

Биопсия почки: Биоптат почки представлен корковым слоем (до 8 клубочков). В клубочках отмечается очаговая пролиферация мезангиоцитов, очаговое расширение мезангия, очаговое утолщение БМК, склероз отдельных сосудистых петель. Эпителий извитых канальцев в состоянии белковой дистрофии, очаговый склероз стромы. Встречаются мелкие лимфогистиоцитарные инфильтраты. При иммуногистохимическом исследовании в мезангии и на ГБМ – гранулярные отложения IgA, M,G и C3. Амилоида не найдено. Заключение: изменения укладывается в картину мезангиопролиферативного ГН.

Выявлены высокие уровни нефрина в моче - 20,7 нг/мл (у здоровых 7,9 [1,7;9,5], подоцитурии – до 31рdx+кл/мкл (0[0;0,6]), выраженная подоцитопения (до 16 кл/п.зр.)(контроль 44[38;47])

Начато лечение МП в дозе 48 мг/сут и внутривенными введениями сверхвысоких доз МП и ЦФА. В течение года проведено 9 сочетанных «пульсов» МП (суммарная доза 7975 мг) и ЦФА (суммарная доза 4200мг), однако сохранялся НС прежней выраженности (СПУ – 4,5-6,96г/сут, общ. белок – 4,9г/л (57-82), альбумин – 27,2 (32-48)г/л, Хс – 359мг/дл (150-250).

Комментарий: *У больной в дебюте болезни и на протяжении всего срока наблюдения выявлялся умеренно выраженный нефротический синдром с сохранной функцией почек, мягкой артериальной гипертонией, что в сочетании с нетяжелым морфологическим вариантом заболевания - мезангиопролиферативный ГН с низкой степенью склероза в тубулоинтерстициальных структурах почки, позволяло предполагать благоприятный прогноз. Однако, несмотря на адекватную по дозе и*

длительности иммуносупрессивную терапию, не было получено ожидаемого эффекта. На высокий риск неэффективности иммуносупрессивной терапии указывает выявленный у больной высокий уровень подоцитарных показателей и выраженная подоцитопения в клубочках почек, отражающие тяжесть повреждения подоцитов, несмотря на достаточно умеренные клинические проявления.

Клинический пример N4

Больная, 54лет.

Летом 2009г. остро появились отеки голеней, в сентябре 2010г. в стационаре по месту жительства выявлена картина тяжелого нефротического синдрома (ПУ до 13,2г/сут, выраженное снижение альбумина сыворотки крови) при сохранной функции почек и нормальном АД. Диагностирован ХГН нефротического типа, назначен преднизолон внутрь 50мг и внутривенно в сочетании с ЦФА. До III. 2011 проведено 5 сеансов сочетанной «пульс» терапии, суммарная доза ЦФА составила 4,6г. В III. 2011г. госпитализирована в клинику с тяжелым отечным синдромом.

Биопсия почки: биоптат почки представлен корковым слоем (до 37 клубочков) и тканью пирамид. В клубочках отмечается диффузное утолщение базальных мембран капилляров, склероз отдельных сосудистых петель, расширение мезангия, эпителий извитых канальцев в состоянии гидротической дистрофии эпителия и очаговой субатрофии. Очаговый склероз стромы. Очаговые лимфогистиоцитарные инфильтраты. Амилоида не найдено. При иммуногистохимическом исследовании обнаружена фиксация IgG диффузного мелкогранулярного характера. Заключение: картина мембранозной нефропатии 2-3 ст.

Проводилось обследование для исключения паранеопластической природы мембранозной нефропатии, данных за опухоль не получено. Учитывая сохраняющийся высокий риск прогрессирования согласно современной стратификации риска МН, неэффективность ранее проведенной терапии стероидами и циклофосфамидом и развитие иммунодефицита, назначена альтернативная схема лечения циклоспорином А в дозе 200мг/сут. с поддерживающими малыми дозами преднизолона, который пациентка принимала в течение 3 мес. Эффект в отношении протеинурии отсутствовал. В связи с повышением уровня креатинина сыворотки крови препарат отменен в VIII 2011г.

Учитывая сохраняющуюся активность ХГН и НС вновь начата терапия сочетанными «пульсами» ПЗ и ЦФА с достижением кумулятивной дозы к V 2012г -9,4г., а ПЗ (в/в) - 15,5г. Выраженность НС несколько уменьшилась, однако ремиссии достичь не удалось. В VI.2012г. продолжена терапия цитостатиками - препаратами микофенолата мофетила (селлсепт) в дозе 2г/сут.. Ремиссии удалось достичь только через 10 мес. приема селлсепта, через год ПУ < 0,5г/сут, белковые показатели сыворотки крови в пределах нормы, функция почек сохранна, СКФ >90 мл/мин.

Таким образом, данное наблюдение демонстрирует торпидное течение (на протяжении 3 лет) тяжелого нефротического синдрома. Упорная иммуносупрессивная терапия имела в конечном счете положительный эффект и привела к ремиссии заболевания, что доказывает патогенетическую обоснованность избранной тактики.

У больной в период наибольшей выраженности НС выявлен высокий показатель нефринурии – 28,0 нг/мл (1,7-9,5 нг/мл у здоровых), величина подоцитурии была достаточно высокой – 20,0 рдх+кл/мкл (0-0,6 у здоровых).

Образцы мочи были взяты для исследования до проведения биопсии почки. Показатель БТШ27 был в зоне высоких значений – 2,0 нг/мл (0,66-0,96 нг/мл у здоровых), отражая тяжесть подоцитарной дисфункции, при этом выявлялась

умеренная подоцитопения – 31 кл/срез клубочка (38-47 в здоровой ткани почки). Показатели провоспалительных цитокинов составляли: ИЛ-6 – 64,16 нг/мл (1,05-4,26 нг/мл у здоровых), MCP-1 – 13,5 нг/мл (1,05-4,26 нг/мл у здоровых), VEGF – 338 пг/мл (54,8-73,5 пг/мл у здоровых), каспаза -9 – 32,7 нг/мл (31,2-31,6 нг/мл у здоровых).

Низкий уровень антител к БТШ70 коррелировал с плохим ответом на иммуносупрессивную терапию, что было отмечено и у нашей пациентки – 12,5 нг/мл (15,0-24,0 нг/мл), отмечались следовые количества ИЛ-10 в моче, количество Трег клеток в почечных инфильтратах составляли 2,5 кл/п.зр.

Все полученные результаты согласуются с особенностями течения болезни у представленной больной. Наличие выраженной подоцитарной дисфункции и снижения факторов самозащиты объясняло торпидное течение нефротического синдрома, в то же время отсутствие нарушения функции почек, склеротических изменений, выраженной подоцитопении и сочетание высоких показателей подоцитарного повреждения с маркерами локально-почечного воспаления обосновывало продолжение упорной ИС-терапии, что привело в конечном итоге к положительному эффекту.

Клиническое наблюдение 5.

Пациентка Б., 27 лет.

В анамнезе – часто рецидивирующие обострения хронического тонзиллита.

В 2010г, во время первой беременности, на сроке 16 нед. впервые выявлена протеинурия до 0,3 г/л. На сроке 38 недель в связи с нарастанием протеинурии до 13 г/л проведено экстренное родоразрешение. Через 2 месяца после родоразрешения СПУ составляла 0,99 г, мочевого осадок неактивный. Функция почек стойко сохранная (креатинин сыворотки 68 мкмоль/л). Диагноз – хронический гломерулонефрит латентного течения. В январе 2012 года отмечено обострение: нарастание белка в моче до 2,7 г/л, креатинина до 129

мкмоль/л, повышение уровня артериального давления до 160/100 мм рт. ст., пациентка госпитализирована в клинику.

Биопсия почки: Биоптат почки представлен корковым слоем (до 6 клубочков). 2 клубочка полностью склерозированы. В клубочках - очаговая пролиферация мезангиоцитов, очаговое расширение и склероз мезангия, очаговое утолщение базальных мембран капилляров, склероз отдельных сосудистых петель с образованием долек, множество синехий. Эпителий извитых канальцев в состоянии белковой дистрофии и распространенной атрофии. В просвете канальцев белковые цилиндры. При ИГ исследовании обнаружена фиксация IgG, А, М и С3 на ГБМ мелкогранулярного характера. Фибриноген фиксируется на ГБМ и мезангии. Очагово-распространенный склероз стромы. Очаговые лимфомакрофагальные инфильтраты. Артериолосклероз. Амилоида не найдено. *Заключение:* картина мезангиокапиллярного гломерулонефрита с фибропластической трансформацией и тубуло-интерстициальным компонентом.

Установлен диагноз хронический гломерулонефрит с выраженным мочевым синдромом с нарушением функции почек (морфологически – мезангиокапиллярный гломерулонефрит с фибропластической трансформацией и тубуло-интерстициальным фиброзом.). Учитывая клинические и морфологические признаки активности ХГН, назначен метипред 32 мг/сут per os, и сочетанные «пульсы» ПЗ и ЦФА. С III. 2012г по X.2012г проведено 5 сеансов «пульс»-терапии (суммарно за период лечения введено ПЗ 6500 мг и ЦФА 4000 мг.). В результате проводимой терапии отмечено снижение протеинурии 0,3 г/сут, креатинина с 1,51 до 1,28 мг/дл, нормализовались показатели АД. Метипред постепенно снижался до полной отмены. Отмечается стойкая стабильная ремиссия ХГН.

В данном клиническом наблюдении у пациентки в образцах крови и мочи, взятых до биопсии почки, отмечался высокий уровень анти-БТШ70 антител в

сыворотке крови (27,9 пг/мл), низкий уровень ИЛ-10 в моче (0,2 нг/мл). Показатель подоцитурии составил 16 рdx+ кл/мкл, отмечено повышение маркера апоптоза каспазы-9 (36,0 нг/мл) параллельно с повышением уровня VEGF в моче (360 пг/мл). В биоптате количество FoxP3+клеток было достаточно большим и составило до 11 кл/п.зр., умеренная степень экспрессии БТШ-70 в тубулоинтерстиции (+/+++ балла), слабая экспрессия в клубочках (+).

Полученные результаты по определению мочевых и тканевых показателей позволяют предполагать хороший ответ на лечение иммуносупрессивными препаратами, несмотря на имеющиеся морфологические признаки неблагоприятного прогноза – гломерулосклероз и тубуло-интерстициальный фиброз, что и подтвердило достижение стойкой ремиссии ХГН.

Глава 4

Обсуждение

Изменение структуры и функции подоцитов, лежат в основе первичных подоцитопатий – болезни минимальных изменений, ФСГС и мембранозной нефропатий. Однако в последние годы установлено, что повреждение подоцитов встречается не только при истинных подоцитопатиях, но и при других формах гломерулонефрита (ГН) [153]. Выполняя важную роль в поддержании структуры и функции почечного клубочка в норме, подоциты имеют первостепенное значение при его повреждении и прогрессировании заболевания почек [154,242]. Своеобразной «платформой» передачи сигналов, необходимых для поддержания функций подоцита (правильной организации цитоскелета, поляризации, эндоцитоза, дифференцировки, ограничения пролиферации и жизнеспособности клетки в целом), служит межподоцитарная щелевая диафрагма [123, 306]. Стереотипной реакцией подоцита на разнообразные повреждающие факторы (иммунные, гемодинамические, метаболические) является снижение экспрессии структурных белков щелевой диафрагмы, что приводит к изменениям цитоскелета, формы клетки, ножек подоцита, нарушению адгезии к базальной мембране клубочка со слущиванием подоцитов в мочевое пространство, в результате чего нарушается барьерная функция гломерулярного фильтра и развивается ПУ [129, 155, 239]. При этом, как показано в эксперименте, появление и нарастание в моче содержания маркеров повреждения подоцитов является более чувствительным, чем протеинурия, показателем активности болезни [354]. Помимо специфических подоцитарных белков (нефрин, подоцин, подокаликсин) в моче пациентов с различными формами ХГН обнаруживают также сами подоциты [113, 322]. Часть подоцитов, выявляемых в моче, еще сохраняют жизнеспособность, что подтверждено возможностью их выращивания в клеточной среде, а часть подоцитов, экскретируемых с мочой, находятся в состоянии апоптоза [322]. Мы выявили повышение уровня подоцитарного белка нефрина в моче больных с активными формами нефрита, показатель нефрина в

моче нарастал в группах по мере увеличения протеинурии. Помимо нефринурии увеличивалась также и экскреция с мочой целых подоцитов, подоцитурия была более выражена у больных с нефротическим синдромом и коррелировала с уровнем белка в моче. Наиболее высокие показатели нефринурии и подоцитурии выявлены у больных с тяжелым нефротическим синдромом вне связи с морфологической формой нефрита, что позволяет рассматривать их как универсальные маркеры повреждения подоцитов. Выявленные закономерности согласуются с данными литературы об уменьшении экспрессии нефрина, а также уменьшении количества самих подоцитов в ткани почки при активных нефропатиях независимо от их морфологической формы (болезнь МИ, ФГС, МН, мезангиальные формы ГН, волчаночный нефрит, диабетическая нефропатия) [124].

Помимо «классических» маркеров был изучен альтернативный показатель подоцитарного повреждения и нарушения гломерулярного фильтра - белок теплового шока-27 [285]. БТШ27 относится к компонентам системы «самозащиты почки», под влиянием повреждающих факторов вступает в тесную связь с микрофиламентами актина, тем самым способствуя стабилизации актинового цитоскелета [284,285]. Нефосфорилированные формы БТШ-27 обладают наибольшей защитной активностью. Фосфорилирование БТШ-27 с помощью р38-МАРкиназы в подоцитах влечет потерю связи с актиновыми микрофиламентами, приводит к ремоделированию актиновой сети, агрегации и перераспределению микроволокон в клетке и распластыванию ножек подоцитов - процесса, который лежит в основе повышения проницаемости гломерулярного фильтра и протеинурии [40]. Кроме того, БТШ27 принимает участие в ингибции апоптоза и уменьшении воздействия свободных радикалов кислорода, а также оказывает противовоспалительное действие, ингибируя фосфорилирование р38 МАРК [249]. Кроме того, БТШ27 тормозит процессы фиброгенеза почечной ткани: эпителиально-мезенхимальную трансдифференциацию (ЭМТ) клеток, превращение их в миофибробласты и накопление коллагена в ткани почки [318].

В нашем исследовании уровень БТШ-27 в моче был выше у пациентов с НС и прямо коррелировал с его тяжестью - выраженностью ПУ и степенью снижения альбумина сыворотки крови. У больных ХГН с НС нами выявлены достоверные корреляции между нефринурией, подоцитурией и уровнем БТШ27 в моче – показателями, характеризующими дисфункцию подоцитов, как ведущего патогенетического звена развития протеинурии. Так как содержание белка теплового шока 27 в клетке под действием повреждающих факторов резко возрастает, у пациентов с НС имеет место тяжелое повреждение подоцитов, значительная потеря этих клеток с выходом внутриклеточных белков в мочу. Таким образом, повышение уровня БТШ27 в моче может рассматриваться как свидетельство активации, с одной стороны, и нарушения механизмов самозащиты подоцита, с другой стороны.

Важной составляющей механизма потери подоцитов и нарастания протеинурии является усиление апоптоза этих клеток, маркерами которого служит активация каскада внутриклеточных каспаз. Нами отмечено повышение экскреции с мочой одной из них, каспазы-9 у больных активными формами ХГН, главным образом с НС, параллельно величине нефринурии.

Мы получили еще одно свидетельство снижения выживаемости подоцитов, на основании изучения экскреции с мочой антиапоптотического фактора VEGF. По данным эксперимента, VEGF продуцируется подоцитами, поддерживает структуру и функцию эндотелиального монослоя и самих подоцитов, способствуя, таким образом, сохранению целостности фильтрационного барьера [100,109]. Нарушение фосфорилирования нефрина в условиях дефицита VEGF приводит к ослаблению связывания нефрина с подоцитом, в результате чего внеклеточная часть молекулы нефрина отщепляется от мембраны подоцита и экскретируется с мочой [100].

Уровень VEGF в моче в нашем исследовании был максимально высоким у больных с НС, но истощался при присоединении почечной дисфункции, в то же

время нефринурия продолжала нарастать, отражая тяжесть функциональных нарушений подоцитов.

Нарушение соотношения этих биомаркеров и истощение продукции VEGF у больных прогрессирующими формами ХГН можно рассматривать как следствие снижения числа подоцитов – развития подоцитопении в клубочках за счет прогрессирующей потери подоцитов с мочой, что клинически проявляется высокой протеинурией и нарушением функции почек из-за сопутствующего гломерулосклероза.

Кроме того, мы изучили у больных ХГН экспрессию в клубочках почек ММП-9, которая отражает интенсивность эпителиально-мезенхимальной трансдифференциации подоцитов, ведущей к отслойке трансформированных подоцитов в мочу. При активных формах ХГН отмечено увеличение количества ММП-9 в клубочках почек, что сочеталось с высокими показателями нефринурии, указывая на важную роль этих механизмов в усилении потери подоцитов и развитии подоцитопении в ткани почки.

С помощью иммуногистохимического исследования почечного биоптата с оценкой ядерной экспрессии в подоцитах антигена опухоли Вильмса (WT-1) прогрессирующая потеря подоцитов подтверждена у пациентов с прогностически наиболее неблагоприятной формой ХГН - тяжелым НС с почечной дисфункцией, особенно при торпидном течении. Отмечалась корреляция между величиной подоцитурии и выраженностью подоцитопении, которую в настоящее время рассматривают как детерминанту гломерулосклероза [143, 157]. Так как подоциты являются высокодифференцированными клетками с ограниченным пролиферативным потенциалом, уменьшение их числа приводит к необратимому дефекту клубочкового фильтра, способствует формированию синехий между капиллярными петлями и капсулой клубочка почки и является пусковым механизмом для начала склерозирования клубочков. Эти изменения сопровождаются высокой экскрецией с мочой маркеров повреждения подоцитов (нефринурии, подоцитурии, экскреции БТШ-27), что обосновывает возможность

применения подоцитарных маркеров для оценки степени подоцитопении и эффективности иммуносупрессивной терапии.

Влияние подоцитарной дисфункции на характер течения хронического гломерулонефрита наглядно прослеживалась при анализе эффекта иммуносупрессивной терапии: у больных с высоким исходным уровнем нефринурии и подоцитурии и низким уровнем VEGF ответ на терапию был значительно хуже. У большей части больных с исходно высоким уровнем подоцитурии (более 20 кл/мкл) и нефринурии (более 17нг/мл) ХН характеризовался резистентностью к иммуносупрессивной терапии, несмотря на длительное (от 9 мес. до 3 лет.) применение различных схем лечения, рекомендованных для определенных клинико-морфологических вариантов ХН. Относительный риск резистентности к проводимой терапии для показателя подоцитурии был в 5 раз выше. Таким образом, исходный уровень этих показателей позволяет прогнозировать ответ на лечение у больных ХН. При этом показатели нефринурии и подоцитурии обладают более высокой информативностью (большей площадью под кривой) для прогнозирования течения хронического гломерулонефрита и ответа на терапию по сравнению с другими общепризнанными факторами прогноза (уровнем протеинурии и креатинина сыворотки крови).

Нарушения функции подоцитов при ХН протекают параллельно с процессами ремоделирования тубуло-интерстиция: повреждения тубулярного эпителия, тубуло-интерстициального воспаления и фиброза – в первую очередь как следствие несостоятельности системы самозащиты почки в условиях нефротоксического действия протеинурии. Нами изучена экспрессия в различных структурах почки одного из компонентов этой системы, БТШ70.

Экспрессия БТШ-70 в ткани почки обнаружена у всех больных активным течением ХН. В целом мочевые и тканевые показатели БТШ-70 изменялись однонаправленно: отмечена интенсивная экспрессия этого фактора в почке и усиленная его экскреция с мочой при различных морфологических формах

нефрита, протекающих с протеинурией и НС, что позволяет предполагать локально-почечное происхождение выявляемого в моче БТШ-70.

Мы выявили экспрессию БТШ-70 у больных ХГН в различных структурах ткани почки с преимущественной локализацией в тубуло-интерстиции, что согласуется с результатами, полученными в другом исследовании [317]. Согласно нашим результатам экспрессия БТШ70 в клубочках почки была более интенсивной у больных с НС, чем у больных с меньшей протеинурией, при этом различия были недостоверны. Однако интенсивность тубуло-интерстициальной экспрессии БТШ-70 была значимо выше в этой группе больных. Показатель экспрессии коррелировал с величиной протеинурии и уровнем БТШ-70 в моче больных ХГН. При этом наиболее интенсивное окрашивание БТШ-70 выявлялась в эпителиальных клетках канальцев. Учитывая современные представления о нефротоксическом действии протеинурии, накопление БТШ70 преимущественно в тубуло-интерстициальной ткани почки можно расценивать как ответ тубулярных клеток на повреждение и активацию процессов ремоделирования тубуло-интерстиция почки. Таким образом, характер распределения и интенсивности экспрессии БТШ-70 в почке зависел от выраженности протеинурии и нефротического синдрома.

Нами изучен и уровень БТШ70 в моче, экскреция которого, как и в случае БТШ27, отмечалась у больных с НС тяжелого течения с почечной дисфункцией, коррелируя с уровнем протеинурии и креатинина сыворотки крови. Уровень БТШ 70 в моче значительно нарастал у больных с высокой протеинурией, имеющих наиболее выраженные признаки повреждения клеток тубуло-интерстиция, что позволяет также рассматривать этот тест как показатель выхода внутриклеточной фракции БТШ70 в мочу.

Помимо функции БТШ70 как шаперона, известны его иммунорегуляторные и противовоспалительные эффекты [10]. Впервые иммунорегуляторная роль БТШ при воспалительных заболеваниях была установлена, когда при введении БТШ экспериментальным животным с аутоиммунным артритом был получен

противовоспалительный эффект [313]. Расположенные внутриклеточно БТШ при воспалении и повреждении клеток могут экспрессироваться на их поверхности или выделяться во внеклеточное пространство [34,218]. Эти эпитопы БТШ70 распознаются Т лимфоцитами с формированием пула регуляторных (противовоспалительных) Трег клеток, продуцирующих противовоспалительный ИЛ-10, и оказывающих мощное противовоспалительное действие. Основным регулятором дифференцировки этого фенотипа Т рег клеток является транскрипционный фактор forkhead box P3 (FoxP3). Эти клетки участвуют в механизме иммунологической толерантности к собственным антигенам и обеспечивают контроль иммунного ответа, в том числе при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях [2, 4, 18]. Трег клетки оказывают супрессивное действие на эффекторные и цитотоксические Т лимфоциты при непосредственном клеточном контакте, снижают активацию и пролиферацию других клеток воспалительного инфильтрата – макрофагов [296], дендритных клеток [204], В клеток [180], NK клеток [105] и нейтрофилов [175]. Трег обладают противовоспалительным действием также за счет продукции противовоспалительного ИЛ-10 [234,270]. При нефритах активация экспрессии БТШ клетками почек установлена в клетках инфильтрата при остром интерстициальном нефрите [317]. Напротив, при прогрессирующем хроническом воспалении с развитием фиброза значительного повышения экспрессии БТШ резидентными клетками и клетками инфильтрата ткани почек выявлено не было. Снижение экспрессии БТШ-70 было также отмечено и в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с хроническими заболеваниями почек по сравнению с контролем. При этом выраженное снижение экспрессии БТШ-70 отмечалось у больных с терминальной хронической почечной недостаточностью [197]. Можно предполагать, что адекватная воспалению экспрессия БТШ на поверхности клеток имеет важное значение для обеспечения противовоспалительных механизмов, особенно с учетом того, что эти белки

оказывают протективный эффект при различных хронических воспалительных заболеваниях [206,253,314].

Мы оценили взаимосвязь уровня защитных БТШ в моче с показателями мочевой экскреции противовоспалительного цитокина ИЛ-10. ИЛ-10 относится к инактиваторам лейкоцитов и резидентных клеток в процессе воспаления и оказывает мощный противовоспалительный эффект, ингибируя продукцию ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α [76], хемотаксических факторов [233], реактивных радикалов кислорода и простагландинов [203], уменьшая приток лейкоцитов в область воспаления. По мере нарастания активности нефрита и развития НС мы наблюдали увеличение экскреции с мочой БТШ-70, в то время как уровень ИЛ-10 прогрессивно снижался до следовых показателей. Несмотря на активацию функции БТШ70 как шаперона у больных прогрессирующими формами нефрита, по-видимому, имеется недостаточность (дефицит) его иммунорегуляторной функции. Кроме того, мы изучили содержание антител к БТШ70, продукция которых, как мы полагаем, может отражать иммунорегуляторную функцию БТШ-70.

Мы показали, что уровень антител к БТШ-70 в сыворотке крови у больных с активными формами ХГН был более высокий, чем у больных с неактивным течением. Однако при прогрессирующем течении нефрита, клинически характеризующемся сочетанием выраженного НС и нарушением функции почек, мы отметили уменьшение антител к БТШ-70 в сыворотке крови, а также снижение количества FoxP3-позитивных Т регуляторных клеток в ткани почки и экскреции ИЛ-10 с мочой. В этом случае снижение уровня антител к БТШ-70 имело неблагоприятное прогностическое значение в отношении ответа на иммуносупрессивную терапию.

В последние годы широко обсуждается значение антител к БТШ 70 в сыворотке крови как критериев активности различных иммуновоспалительных и аутоиммунных заболеваний. В большинстве исследований при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, васкулитах продемонстрировано увеличение

уровня антител к БТШ, в том числе, анти- БТШ-70-антител (12). В некоторых случаях повышение уровня антител к БТШ являлось предиктором неблагоприятного исхода заболевания [342]. В то же время, существуют и противоположные данные о том, что снижение уровня антител к БТШ70 повышает риск неблагоприятного течения заболевания. Так, Zhanq X. и соавт. показали, что высокое содержание БТШ-70 в сыворотке крови в сочетании с низким титром антител к БТШ-70 отражает высокий риск прогрессирования атеросклероза и развития сердечно-сосудистых осложнений [360]. В другом исследовании (Dulin E. et al.), снижение уровня циркулирующих антител к БТШ также повышало риск развития осложнений ишемической болезни сердца [86]. У больных с тяжелым течением псориаза также было отмечено снижение концентрации антител к БТШ70 [11]. Однако изучения уровня анти- БТШ-70 антител в сыворотке крови больных ХГН ранее не проводилось.

В нашем исследовании снижение уровня анти-БТШ-70 антител отмечено у больных с неблагоприятными прогрессирующими формами ХГН (с НС и почечной дисфункцией). Значение такой динамики антител до конца не ясно /определено. Существует гипотеза о том, что снижение антител можно объяснить потреблением анти-БТШ70-антител в иммунные комплексы [360]. С другой стороны, уменьшение уровня антител к БТШ-70, может происходить и за счет снижения доступности эпитопов БТШ70 на поверхности антиген-презентирующих иммунных клеток [1]. Одновременное снижение количества Т-регуляторных противовоспалительных клеток и продуцируемого ими ИЛ-10 может являться косвенным аргументом в пользу этого предположения.

Наряду с белками теплового шока, количеством Т регуляторных клеток и ИЛ-10, было изучено еще одно звено «самозащиты почки» - уровень в моче антагониста рецептора ИЛ-1[229]. ИЛ-1ра является индуцируемой молекулой – основным естественным ингибитором ИЛ-1. В процессе иммунного воспаления ИЛ-1ра экспрессируется воспалительными моноцитами/макрофагами, а также резидентными клетками почек под действием ИЛ-1, а также других медиаторов, в

том числе ИЛ-6, что продемонстрировано в культуре клеток, в эксперименте и у человека [97,232, 328].

Уровень ИЛ-1 α в моче нарастал у больных с НС параллельно факторам воспаления. При присоединении к НС почечной недостаточности содержание ИЛ-1 α в моче резко снижалось, что, по-видимому, является следствием нарастающего дисбаланса в противовоспалительной системе в этой группе больных. Так, в экспериментальном исследовании Tam и соавт. показано, что несмотря на многократное повышение, эндогенного ИЛ-1 α оказывается недостаточно для подавления ИЛ-1-индуцированного воспаления при анти-БМК-нефрите [298].

Другим свидетельством дисбаланса механизмов «самозащиты почки» и повреждения, ведущих к активации процессов воспаления и эпителиально-мезенхимальной трансформации, было выявленное нами у больных с НС и почечной дисфункцией нарушение соотношения экскретируемых с мочой провоспалительной матриксной металлопротеиназы-2 и ингибитора ТИМП-2. У больных с нарушением функции почек было отмечено увеличение экскреции с мочой ММП-2 с одновременным снижением ее ингибитора - ТИМП-2.

Основной функцией матриксных металлопротеиназ является контроль расщепления и накопления компонентов экстрацеллюлярного матрикса, однако при тяжелом воспалении ММП в большей степени выполняют провоспалительную функцию, активируя цитокины, факторы роста, адгезивные молекулы, и, расщепляя компоненты базальных мембран, способствуют процессу эпителиально-мезанхимальной трансдифференциации клеток [287]. ММП находятся под контролем соответствующих тканевых ингибиторов (ТИМП) [23, 263, 315].

ММП-2 продуцируется фибробластами, эпителиальными клетками и мезангиальными клетками. При гломерулонефрите повышение уровня ММП ассоциировано с активностью заболевания и привлечением клеток воспаления, а уровень и длительность повышения ММП определяет распространенность

повреждения клубочков. Несмотря на функцию протеолиза, матриксные металлопротеиназы скорее оказывают провоспалительный и профиброгенный эффект, индуцируя синтез профиброгенных цитокинов, в частности TGF бета. Кроме того, ММР запускают процесс эпителиально-мезенхимальной трансформации, в том числе подоцитов, способствуя нарастанию гломерулосклероза и интерстициального фиброза [79, 259].

О нарушении баланса со сдвигом в сторону провоспалительных факторов свидетельствует и увеличение экскреции у больных с НС интерлейкина-6 и хемокина MCP-1, участвующего в развитии ТИФ, а также в нарушении функции подоцитов с развитием гломерулосклероза. Согласно результатам ряда экспериментальных работ провоспалительные цитокины - ИЛ-6 и MCP-1 имеют важное значение в развитии повреждения подоцитов при протеинурических формах ХГН [169, 214]. Взаимодействие MCP-1 с хемокиновыми рецепторами приводит к активации фактора транскрипции NFkB с последующей продукцией провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-6 [319]. Так, на культуре клеток показано, что подоциты имеют рецепторы к основным провоспалительным цитокинам и при активации могут продуцировать ИЛ-6, являясь таким образом не только объектом повреждения, но и активным участником воспаления в клубочках почек. ИЛ-6, в свою очередь, через активацию SMAD-сигнала реализует профиброгенный потенциал MCP-1 за счет синтеза TGF-бета [126, 361]

Уровни экскреции провоспалительных факторов MCP-1 и ИЛ-6 были достоверно выше у больных с НС и коррелировали с величиной протеинурии и креатинина сыворотки крови. Кроме того, установлена связь между мочевыми показателями подоцитурии, уровнем БТШ-27 и ИЛ-6 в моче, особенно у больных с тяжелыми формами нефрита с НС и почечной недостаточностью.

У больных хроническим гломерулонефритом отмечается увеличение уровня провоспалительных факторов от группы с мочевым синдромом к группе с НС и, особенно высокими факторы повреждения определяются у больных с почечной дисфункцией. Параллельно повреждающим факторам увеличивается количество

противовоспалительных клеток и секретируемых ими противовоспалительных цитокинов, направленных на ограничение воспаления и повреждения. Однако при длительном персистировании воспаления возникает дисбаланс в системе противовоспалительных механизмов: при нарастании факторов повреждения, апоптоза, матриксных металлопротеиназ отмечается уменьшение количества противовоспалительных клеток в ткани почки, снижение секреции противовоспалительных цитокинов, истощение факторов выживаемости, что приводит в итоге к прогрессированию ХГН с нарушением функции почек.

Повышение показателей подоцитарного повреждения параллельно увеличению уровня провоспалительных цитокинов и белков теплового шока свидетельствуют о том, что по мере нарастания активности ХГН и эффекторных (повреждающих механизмов), одновременно происходит индукция внутриклеточных механизмов самозащиты, направленных на ограничение структурных повреждений почечной ткани. Исход заболевания будет определяться тем, какое звено воспалительного процесса станет преобладающим.

Суммарная оценка полученных результатов послужила обоснованием разработки нового подхода к лечению больных ХГН через таргетное воздействие на различные факторы повреждения и «системы самозащиты почки». В частности, нами предпринята попытка применения в клинической практике лечения больных активными протеинурическими формами ХГН отечественного препарата, являющегося конкурентным ингибитором MCP-1 (пептида X 65-76) - одного из важных медиаторов подоцитарного повреждения и ремоделирования тубуло-интерстиция. Отмеченный нами быстрый антипротеинурический эффект подтверждает экспериментальные данные о роли MCP-1 в развитии протеинурии через участие в механизмах подоцитарной дисфункции и обосновывает разработку препаратов, ингибирующих эффекты MCP-1.

Глава 5.

Заключение

На основании проведенного исследования подтверждена важная роль подоцитарного повреждения и нарушений системы самозащиты почки в прогрессировании ХГН.

Признаки подоцитарной дисфункции отмечены у больных с активными формами хронического гломерулонефрита, проявляющимися протеинурией и нефротическим синдромом. В группах больных с высокой протеинурией, особенно при нефротическом синдроме, выявлялся повышенный уровень экскреции с мочой подоцитов (подоцитурия) и их структурных белков (белка щелевой диафрагмы нефрина и белка теплового шока -27), что отражает тяжесть повреждения подоцитов.

Изучены механизмы, которые приводят к потере подоцитов и развитию подоцитопении – важного фактора гломерулосклероза и почечной недостаточности. В группах больных с прогрессирующим течением ХГН (с НС и нарушением функции почек) отмечалось значительное увеличение в моче маркера апоптоза – каспазы-9, уменьшение фактора выживаемости подоцитов – VEGF и рост показателей подоцитарного повреждения – нефринурии и подоцитурии. Такой спектр мочевых биомаркеров отражает усиленное слущивание поврежденных и погибших подоцитов с гломерулярной базальной мембраны, косвенно указывая на обеднение общей массы подоцитов в клубочках почек (развитие подоцитопении). Подоцитопения у данной категории больных ХГН была подтверждена при морфометрическом исследовании ткани почки по снижению экспрессии ядерного подоцитарного маркера WT-1. Наряду с активацией апоптоза, как одного из механизмов потери подоцитов и развития гломерулосклероза, подтверждена активация и процесса эпителиально-мезенхимальной трансдифференциации поврежденных подоцитов, о чем свидетельствует обнаружение у пациентов с НС и высокой нефринурией интенсивной экспрессии в клубочках металлопротеиназы-9. Наглядно

продемонстрировано влияние подоцитарной дисфункции на характер течения ХГН и ответ на иммуносупрессивную терапию: у больных с высоким исходным уровнем нефринурии и подоцитурии и низким уровнем в моче VEGF отмечалось торпидное течение НС, а его ремиссии развивались редко.

У больных с активными протеинурическими формами ХГН выявлен дисбаланс факторов повреждения и «самозащиты почки», который заключался в увеличении провоспалительных факторов (MCP-1, ИЛ-6 и металлопротеиназы-2) и снижении противовоспалительных (ИЛ-10, ИЛ-1 α и тканевого ингибитора металлопротеиназы-2) факторов в моче. Несостоятельность «системы самозащиты почки» проявлялась и в том, что несмотря на компенсаторное повышение у больных с наиболее тяжелым течением ХГН (с НС и нарушением функции почек) экспрессии в ткани почки протективного БТШ-70, отмечалось снижение сывороточного уровня антител к БТШ-70 наряду с уменьшением в ткани почки количества Т-регуляторных противовоспалительных (Foxp3) клеток и снижением экскреции с мочой продуцируемого этими клетками защитного ИЛ-10.

В результате проведенной работы показана возможность у больных ХГН с помощью мочевых и сывороточных тестов определять и неинвазивным способом мониторировать выраженность гломерулярного повреждения, оценивать риск развития гломерулосклероза, прогнозировать ответ на терапию. Прогностически неблагоприятным, отражающим тяжелое повреждение подоцитов и возможную неэффективность иммуносупрессивной терапии, является спектр маркеров, характеризующийся высокими уровнями нефринурии и подоцитурии, низкими уровнями антител к БТШ-70 в сыворотке крови и VEGF в моче. Включение определения данных показателей в план обследования больных ХГН позволит выделить среди пациентов группу риска прогрессирующего течения болезни и худшего ответа на проводимую патогенетическую терапию.

В результате исследования обосновано направление таргетного воздействия на один из основных провоспалительных медиаторов MCP-1 с целью торможения

роста протеинурии и ремоделирования ткани почки. Применение у больных активными формами ХГН конкурентного антагониста провоспалительного хемокина МСР-1 привело к снижению протеинурии, что обосновывает блокирование эффектов МСР-1 как перспективный метод таргетного воздействия с целью снижения протеинурии.

Выводы

1. У больных ХГН, клинически протекающим преимущественно с протеинурией (ПУ) и нефротическим синдромом (НС), независимо от морфологического варианта нефрита, выявляется повреждение подоцитов, сопровождающееся экскрецией с мочой структурного белка щелевой диафрагмы - нефрина и цитоскелета подоцита - белка теплового шока (БТШ -27), слущиванием в мочу – подоцитурией; выраженность этих изменений зависит от особенностей клинического течения ХГН, в первую очередь, от уровня ПУ, выраженности НС, наличия дисфункции почек.
2. Увеличение протеинурии и нефринурии у больных активными формами ХГН сопровождается усилением процесса апоптоза подоцитов в почке, проявляющимся повышением содержания в моче каспазы-9 и одновременным увеличением экскреции фактора выживаемости подоцитов – VEGF вследствие компенсаторной активации его синтеза; у пациентов с НС и почечной дисфункцией отмечается истощение продукции VEGF, что при персистировании высокого уровня в моче каспазы-9 и нефрина свидетельствует о прогрессирующем подоцитарном повреждении.
3. У больных ХГН с массивной ПУ и НС отмечается уменьшение количества подоцитов в клубочках почек - подоцитопения, выявляемая по снижению экспрессии ядерного подоцитарного маркера WT-1; степень подоцитопении коррелирует с величиной подоцитурии ($R_s = -0,6$, $p < 0,01$) и выраженностью почечной дисфункции (для Cr $R_s = 0,36$, $p < 0,05$, для СКФ $R_s = -0,4$, $p < 0,05$). По данным ROC-анализа информативным показателем ($AUC = 0,784$) выраженной подоцитопении (более 50%), указывающей на высокий риск развития гломерулосклероза, является высокий уровень подоцитурии (более 20 клеток в мкл мочи).

4. У больных с прогрессирующим течением ХГН (НС с почечной дисфункцией) признаки подоцитарного повреждения сочетаются с несостоятельностью «системы самозащиты почки», характеризующейся снижением экскреции с мочой противовоспалительных факторов – ИЛ-1 α , ТИМП-2, ИЛ-10, уменьшением количества в клеточных интерстициальных инфильтратах почки регуляторных Т клеток – основных продуцентов противовоспалительного ИЛ-10 и повышением содержания в моче провоспалительных факторов - МСР-1, ИЛ-6, металлопротеиназы-2.
5. Следствием нарушения в «системе самозащиты ткани почки» является протеинурическое ремоделирование тубуло-интерстиция, одним из ключевых звеньев которого является нарушение функции системы белков теплового шока, прежде всего БТШ70: у больных с высокой ПУ и НС отмечается повышение экспрессии в тубуло-интерстициальной ткани почки БТШ 70 и пропорциональное величине протеинурии увеличение его экскреции с мочой.
6. Нарушение в системе БТШ70 выражается также в изменении их иммунорегуляторной функции – в снижении уровня антител к БТШ70 в сыворотке крови у больных с НС, особенно с почечной недостаточностью, параллельно уменьшению количества Т-рег клеток в интерстициальных инфильтратах и экскретируемого с мочой ИЛ-10.
7. Среди изученных показателей подоцитарного повреждения и факторов «системы самозащиты почки» наиболее информативными для оценки прогноза и эффективности проводимой иммуносупрессивной терапии у больных ХГН являлись уровни подоцитурии (AUC =0,846), нефринурии (AUC=0,818), экскреции с мочой VEGF (AUC= 0,679) и сывороточный уровень антител к БТШ70 (AUC =0,613).

8. Начальный положительный опыт получения антипротеинурического эффекта при применении ингибитора МСР-1 (пептида X 65-76) у больных активными протеинурическими формами ХГН подтверждает перспективность разработки методов таргетного воздействия на подоцитарную дисфункцию, в частности на один из основных провоспалительных факторов - МСР-1, оказывающих повреждающее действие на подоциты при ХГН.

Практические рекомендации

1. У больных ХГН наряду с общепризнанными маркерами - протеинурией и креатинином/СКФ, которые используются для оценки активности и прогноза хронического гломерулонефрита, высокой информативностью обладают высокий уровень экскреции с мочой подоцитов (более 20 клеток/мкл мочи) и нефрина (>17 нг/мл) при низкой экскреции VEGF (<124 нг/мл), отражающих степень подоцитарного повреждения и потери подоцитов с мочой.
2. Увеличение показателя подоцитурии более 20 кл/мкл мочи и снижение VEGF в моче менее 124 нг/мл отражают тяжесть воспалительной реакции в почке и выраженности подоцитопении (более 50% общего пула подоцитов в клубочке) и, следовательно, риск развития гломерулосклероза. Мониторирование этих показателей может отражать степень морфологических изменений, в связи с чем их исследование в динамике целесообразно включить в алгоритм ведения больных ХГН с НС.
3. Обнаружение у больных ХГН высокой нефринурii и подоцитурии в 5 раз увеличивает риск торпидного течения нефротического синдрома и может служить показанием для увеличения объема и длительности иммуносупрессивной терапии.
4. Выявление низкого уровня антител к БТШ70 в сыворотке крови (менее 21 нг/мл) при повышенном уровне экскреции БТШ 27 и 70 с мочой является еще одним свидетельством выраженности/тяжести воспалительной реакции и несостоятельности «механизмов самозащиты почки», обосновывающих усиление патогенетической терапии ХГН наряду с применением средств нефропротекции.

Список сокращений

<i>АГ</i>	—	артериальная гипертония
<i>АД</i>	—	артериальное давление
<i>БПГН</i>	—	быстро прогрессирующий гломерулонефрит
<i>БТШ</i>	—	белки теплового шока
<i>БТШ-27</i>	—	белок теплового шока 27
<i>БТШ-70</i>	—	белок теплового шока 70
<i>ГБМ</i>	—	гломерулярная базальная мембрана
<i>ГН</i>	—	Гломерулонефрит
<i>ДАД</i>	—	диастолическое АД
<i>ИЛ-6</i>	—	интерлейкин 6
<i>ИЛ-10</i>	—	интерлейкин 10
<i>МН</i>	—	мембранозный гломерулонефрит
<i>МИ</i>	—	минимальные изменения
<i>МКГН</i>	—	мезангиокапиллярный гломерулонефрит
<i>МПГН</i>	—	мезангиопролиферативный гломерулонефрит
<i>МС</i>	—	мочевой синдром
<i>НС</i>	—	нефротический синдром
<i>ОГН</i>	—	острый гломерулонефрит
<i>ПЗ</i>	—	Преднизолон
<i>ПН</i>	—	почечная недостаточность
<i>ПУ</i>	—	Протеинурия
<i>САД</i>	—	систолическое АД
<i>СЗП</i>	—	свежезамороженная плазма
<i>СКФ</i>	—	скорость клубочковой фильтрации
<i>СПУ</i>	—	суточная протеинурия
<i>Т рег</i>	—	регуляторные Т-лимфоциты
<i>ТИ</i>	—	Тубулоинтерстиций
<i>ФСГС</i>	—	фокально-сегментарный гломерулосклероз

- ХГН — хронический гломерулонефрит
- ХПН — хроническая почечная недостаточность
- FoxP3 — фактор транскрипции T reg

Список литературы

1. Бойко А. А., Ветчинин С. С., Сапожников А. М., Коваленко Е. И. Изменение уровня белков теплового шока семейства 70 кДа в нейтрофилах человека под действием теплового шока // Биоорганическая химия. – 2014. – № 5(40). - С. 528-540.
2. Быковская С.Н., Карасев А.В., Лохонина А.В., Клейменова Е.Б. Анализ Т-регуляторных клеток CD4+CD25+FOXP3+при аутоиммунных заболеваниях// Молекулярная диагностика. – 2013. – №3 - С.20-28.
3. Евдонин А. Л., Кропачева И. В., Медведева Н. Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 кДа запускает множественные сигнальные каскады в клетках A431// Биологические мембраны. – 2009. – №4 (26). - С. 298-304.
4. Железникова Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию// Журнал инфектологии. – 2011. - № 3(1). – С.6-13
5. Зорин И.В. Оптимизация диагностики и прогнозирования тубуло-интерстициального поражения и детей: дис. ... доктора медицинских наук: 14.01.08 - Ор., 2013г. — с.300
6. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. — 2-е изд. —М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 376 с.
7. Кабалык М.А. Клинико-патогенетическое значение белков теплового шока с массой 70 и 27 кДа при остеоартрите// Научно-практическая ревматология. — 2017. - №2(55). – С.187–191
8. Кайгородова Е.В. Молекулярные механизмы регуляторного влияния белка теплового шока 27 кДа на апоптоз опухолевых клеток// Бюллетень сибирской медицины. – 2011. - № 4. – С. 65-70.
9. Котовская М.А. Клиническое значение антител к нуклеосомам и белкам теплового шока при системной красной волчанке. Авторефю дисс. соискание

- канд. мед. наук. – М., - 2007.
- 10.Маргулис Б.А., Гужова И.В. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс// Цитология - 2009. - № 3(51). – С. 219-228
 - 11.Маслаков Н.В., Семенова Ю.О., Снопов С.А., Хайрутдинов В.Р. Содержание антител к белкам теплового шока HPS70 и HspBP1 в сыворотке крови больных псориазом // Дерматология. – 2009. - 84с
 - 12.Мухин Н.А., Ляшко В.Н., Маргулис Б.А. и соавт. Амилоидоз и антитела к белкам теплового шока //Терапевтический архив. – 1992.- №5(64). – С. 79-82
 - 13.Оранский С.П., Елисеева Л.Н., Куринная В.П., Давыдова А.Ф. Нефринурия при нефротическом синдроме у пациентов с ревматоидным артритом// Нефрология. – 2014. - № 5(18). – С. 23-27.
 - 14.Плетень М.В., Траилин А.В., Кривохацкая Ю.А., Остапенко Т.И., Никоненко Т.Н., Никоненко А.С., Ефименко Н.Ф. Дифференциально-диагностическая значимость исследования показателей уроцитогаммы и цитокинов мочи при хронической дисфункции почечного аллотрансплантата// Лабораторная диагностика (Восточная Европа). - 2014. - №3(11). – С. 69-78.
 - 15.Ребров А.П., Захарова Н.Б., Патрикеева Д.А., Карпова О.Г., Оксеньчук А.Н., Попыхова Э.Б. Взаимосвязь содержания факторов роста, цитокинов в сыворотке крови и моче с возрастом у пациентов с системной склеродермией// Актуальные проблемы фундаментальной и клинической уронефрологии [Электронный ресурс]. – 2014. - <https://medconfer.com/node/3291>
 - 16.Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. – 2002. - №1(1). – С. 9-16.
 - 17.Сираева Т.А., Кальметьева Л.Р., Камилов Ф.Х., Еникеева З.М. Клинико-лабораторные маркеры обмена соединительной ткани при гломерулонефрите у детей// Нефрология. - 2014. - №3 (18). – С.70-76.
 - 18.Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функция// Медицинская Иммунология. – 2005. - № 4 (7). – С. 347-354.
 - 19.Шишкин А.Н., Кирилюк Д.В. Дисфункция эндотелия у пациентов с

- прогрессирующими заболеваниями почек // Нефрология. – 2005. - №2 (9).- С. - 16-22.
- 20.Яркова Н.А. Нефрин – ранний маркер повреждения почек при сахарном диабете 2-го типа // Лабораторная диагностика. – 2017. - №2(47). – С.101-103.
 - 21.Aaltonen P, Luimula P, Astrom E, Palmen T, Gronholm T, Palojoki E, Jaakkola I, Ahola H, Tikkanen I, Holthofer H. Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy// Lab Invest. – 2001. – №81. –p.1185–1190.
 - 22.Abrahamson D. R. Glomerulogenesis in the developing kidney // Seminars in Nephrology. – 1991. - №4(11). – p. 375–389.
 - 23.Ahmed AKH. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in kidney scarring: culprits or innocents// Journal of Health Science. – 2009. - №55 (4). –p. 473–483.
 - 24.Akiyama K, Shikata K, Sugimoto H, Matsuda M, Shikata Y, Fujimoto N, Obata K, Matsui H, Makino H. Changes in serum concentrations of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and type IV collagen in patients with various types of glomerulonephritis// Res Commun Mol Pathol Pharmacol. – 1997. - №95. – p.115 -128.
 - 25.Amazonas RB., de Almedia Sanita R, Kawashi H, Lopes de Faria JB. Prevention of hypertension with or without renin-angiotensin system inhibition precludes nephrin loss in the early stage of experimental diabetes mellitus// Nephron Physiol. – 2007. - №107. –p. 57-64.
 - 26.Anders HJ, Frink M, Linde Y, Banas B, Wörnle M, Cohen CD, Vielhauer V, Nelson PJ, Gröne H-J, Schlöndorff D. CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration // J Immunol. – 2003.- №170. –p. 5658-5666.
 - 27.Anders Y-J, Vielhauer V, Kretzler M, Cohen C, Segerer S, Luckow B, Weller L, Gröne H-J, Schlöndorff D. Chemokine and Chemokine Receptor Expression during

- Initiation and Resolution of Immune Complex Glomerulonephritis// J Am Soc Nephrol. – 2001. - №12. – p.919-931.
- 28.Anderson M, Roshanravan H, Khine J, Dryer SE. Angiotensin II activation of TRPC6 channels in rat podocytes requires generation of reactive oxygen species// J Cell Physiol. – 2014. -№229. – p.434–442.
 - 29.Anderton SM, van der Zee R, Prakken B, Noordzij A, van Eden W, Activation of T cells recognizing self 60-kDa heat shock protein can protect against experimental arthritis// J Exp Med. – 1995. - №181. –p. 943-952.
 - 30.Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, Sagrinati C. et al. Characterization of renal progenitors committed toward the tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury// Stem Cells. – 2012. - №30. – p.1714–25.
 - 31.Arakawa T, Masaki T, Hirai T, Doi S, Kuratsune M, Arihiro K. et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis// Nephrol Dial Transplant. – 2008. - №23. – p.3418–26.
 - 32.Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist: A new member of the interleukin-1 family// J Clin Invest. – 1991. - №88. - p.1445-1451.
 - 33.Arene WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. Biologic properties of recombinant human monocyte-derived interleukin-1 receptor antagonist// J Clin Invest. – 1990. - №85. – p. 1694-1697.
 - 34.Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy – review of a new approach// Pharmacol Rev. – 2003. - №55. – p. 241-269.
 - 35.Atkins RC. Interleukin-1 in crescentic glomerulonephritis// Kidney Int. – 1995. - №48. – p. 576-586.
 - 36.Aufricht C, Lu E, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ, van Why SK. ATP releases HSP72 from protein aggregates after renal ischemia //Am J Physiol Renal Physiol. – 1998. - №274. – p.268–274.

37. Baggioli M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines// *Adv Immunol.* – 1994. - №55. – p.197-179.
38. Bailey E, Bottomley MJ, Westwell S. et al. Vascular endothelial growth factor mRNA expression in minimal change, membranous, and diabetic nephropathy demonstrated by non-isotopic in situ hybridisation// *Journal of Clinical Pathology.* - 1999. - №52. - p. 735–738.
39. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A Proposed Taxonomy for the Podocytopathies: A Reassessment of the Primary Nephrotic Diseases// *Clin J Am Soc Nephrol.* – 2007. - №2. –p.529–542.
40. Barutta F, Pinach S, Giunti S, Vittone F, Forbes JM, Chiarle R, Arnstein M, Perin PC, Camussi G, Cooper ME, Gruden G. Heat shock protein expression in diabetic nephropathy// *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2008. - №295. – p.1817–1824.
41. Bassan M, Zamostiano R, Giladi E, Davidson A, Wollman Y, Pitman J, Hauser J, Brennehan DE, Gozes I. The identification of secreted heat shock 60-like protein from rat glial cells and a human neuroblastoma cell line// *Neurosci Lett.* – 1998. – №250. - p. 37–40.
42. Basu S, Binder R, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic, but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, with deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NFkB pathway// *Int Immunol.* – 2000. - №12. – p.1539–1546.
43. Baud L, Fouqueray B, Bellocq A. Switching off renal inflammation by anti-inflammatory mediators: the facts, the promise and the hope// *Kidney Int.* – 1998. - №53. – p.1118-1126.
44. Bauvois B, Mothu N, Nguyen J, Nguyen-Khoa T, Noël LH, Jungers P. Specific changes in plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2 and -9, TIMP-1 and TGF-beta1 in patients with distinct types of primary glomerulonephritis// *Nephrol Dial Transplant.* – 2007. - №22. – p.1115–1122.
45. Becher N, Hein M, Uldbjerg N, Danielsen CC. Balance between matrix

- metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in the cervical mucus plug estimated by determination of free non-complexed TIMP // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2008. - №30. – p.6-45.
46. Beck F-X, Neuhofer W, Muller E. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles and regulation // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2000. - №279. – p.203–215.
47. Benson HL, Mobashery S, Chang M, Kheradmand F, Hong JS, Smith GN, Shilling RA, Wilkes DS. Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells// *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2011. - №44. – p.700–708.
48. Benzing T. Signaling at the slit diaphragm// *J Am Soc Nephrol.* – 2004. - №15. – p.1382-1391.
49. Birnbaum G, Kotilinek L, Miller SD, Raine CS, Gao YL, Lehmann PV, Gupta RS. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis. II: environmental infection and extra-neuraxial inflammation after the course of chronic relapsing encephalomyelitis // *J Neuroimmunol.* – 1998. - №90. – p. 149-161.
50. Ble A, Mosca M, Loreto GD. et al. Antiproteinuric effect of chemokine C-C motif ligand 2 inhibition in subjects with acute proliferative lupus nephritis// *Am J Nephrol.* – 2011. - №34. –p. 367-372.
51. Border WA, Noble NA. Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis// *N.Eng. J. Med.* – 1994. - №331. – p.1286-1292.
52. Buraczynska M, Ksiazek P, Kubit P, Zaluska W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism affects the progression of chronic renal failure// *Cytokine.* - 2006. - №36 (3-4). – p. 167-172.
53. Burt D, Salvidio G, Tarabra E, Barutta F, Pinach S, Dentelli P, Camussi G, Perin PC, Gruden G. The Monocyte Chemoattractant Protein-1/Cognate CC Chemokine Receptor 2 System Affects Cell Motility in Cultured Human Podocytes//*Am J*

Pathol. – 2007. -№171(6). – p.1789–1799.

- 54.Cairns LS, Phelps RG, Bowie L, Hall AM, Saweirs WWM, Rees AJ, Barker RN. The fine specificity and cytoline profile of T-helper cells responsive to the alfa3 chain of type IV collagen in Goodpasture's disease// J Am Soc Nephrol. – 2003. - № 14. – p. 2801-2812.
- 55.Caldas C, Luna E, Spadafora-Ferreira M, Porto G, Iwai LK, Oshiro SE, Monteiro SM, Fonseca JA, Lemos SM, Hammer J, Ho PL, Kalil J, Coelho V. Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses// Clin Exp Immunol. – 2006. №146. – p. 66-75.
- 56.Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 β in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide// J Exp Med. – 1993. - №178. – p. 2207-2211.
- 57.Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies// Am J Physiol Renal Physiol. – 2007. - №292. – p. 905–911.
- 58.Caulfield J, Reid J, Farquhar M. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment// Lab Invest. – 1976. - №34. – p.43–59.
- 59.Chadban SJ, Atkins RC. Glomerulonephritis// Lancet. – 2005. - №365. – p.1797-1806.
- 60.Chan RW, Lai FM, Li EK, Tam LS, Chow KM, Li PK, Szeto CC. Imbalance of Th1/Th2 transcription factors in patients with lupus nephritis// Rheumatology. – 2006. - №45. – p. 951-957.
- 61.Chen A, Sheu LF, Chou WY, Tsai SC, Chang DM, Liang SC, Lin FG, Lee WH. Interleukin-1 receptor antagonist modulates the progression of a spontaneously occurring IgA nephropaty in mice// Am J Kidney Dis. – 1997. - №30(5). – p.693-702.

- 62.Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis// Science.- 1994. - №265. – p.1237-1240.
- 63.Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation// Am J Pathol. – 2003. - №162. - p.1937–1949.
- 64.Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury// FASEB J. – 2006. – №20. – p.1898–1900.
- 65.Chizzonite R, Truitt ., Kilian PL, Stern AS, Nunes AS, Parker KP, Kaffka K, Chua AO, Lugg DK, Gubler U. Two high-affinity interleukin-1 receptors represents separate gene products// Proc Natl Acad Sci USA. – 1989. - №86. – p. 8029-8033.
- 66.Cockwell P, Howie AJ, Adu D. et al. In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis// Kidney Int. – 1998. - №54(3). - p. 827-836.
- 67.Cohen DM, Wasserman JC, Gullans SR. Immediate early gene and HSP70 expression in hyperosmotic stress in MDCK cells// Am J Physiol. – 1991. - №261. – p. 594–601.
- 68.Coletta I, Soldo L, Polentarutti N, Mancini F, Guglielmotti A, Pinza M. et al. Selective induction of MCP-1 in human mesangial cells by the IL-6/sIL-6R complex// Exp Nephrol. – 2000. - 8(1). – p. 37-43.
- 69.Colucci G, Floege J, Schena FP. The urinary sediment beyond light microscopical examination// Nephrol Dial Transplant. – 2006. - №21(6). – p. 1482-5.
- 70.Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy// Diabetologia. – 2001. - №44. – p.1957-1972.
- 71.Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases// J Am Soc Nephrol. – 2012. – №23. – p. 381–99.
- 72.Cowley BD, Muessel MJ, Douglass D, Wilkins W. In vivo and in vitro osmotic regulation of HSP-70 and prostaglandin synthase gene expression in kidney cells//

- Am J Physiol. – 1995. - №269. – p. 854–62.
- 73.Dai Y, Gu L, Yuan W, Yu Q, Ni Z, Ross MJ. et al. Podocyte-specific deletion of signal transducer and activator of transcription 3 attenuates nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis// Kidney Int. – 2013. - №84. – p.950–61.
 - 74.de Kleer IM, Kamphuis SM, Rijkers JT, Scholtens L, Gordon G, de Jager W, Hafner R, van de Zee R, van Eden W, Kuis W, Prakken BJ. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10// Arthritis Rheum. – 2003. - №48. – p.2001-2010.
 - 75.de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4+CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis// J Immunol. – 2004. - №172. – p.6435-6443.
 - 76.de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes// J Exp Med. – 1991. - №174:. - p1209-1220.
 - 77.Detanico T, Rodrigues L, Sabritto AC, Keisermann M, Bauer ME, Zwickey H, Bonorino C. Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation// Clin Exp Immunol. – 2004. - №135. – p.336-342.
 - 78.Dhillon V, Latchman D, Isenberg D. Review: heat shock proteins and systemic lupus erythematosus// Lupus. – 1991. - №1. – p. 3-8.
 - 79.Dimas G, Iliadis F, Grekas D. Matrix metalloproteinases, atherosclerosis, proteinuria and kidney disease: Linkage-based approaches// Hippokratia. - 2013. - №17(4). – p. 292–29.
 - 80.Dinda AK, Mathur M, Guleria S, Saxena S, Tiwari SC, Dash SC. Heat shock protein (HSP) expression and proliferation of tubular cells in end stage renal disease

- with and without haemodialysis// *Nephrol Dial Transplant.* – 1998. - №13. – p. 99-105.
- 81.Dodd SM, Martin JE, Swash M, Mather K. Expression of heat shock protein epitopes in renal disease// *Clinical Nephrology.* – 1993. - №39(5). – p. 239-244.
 - 82.Donnelly R, Donnelly J, Manning G. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage// *J Hypertens.* – 2003. - №21. – p.1627–1630.
 - 83.Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephritic syndrome// *Am J Pathol.* – 2001. - №158 (5). – p. 1723-1731.
 - 84.Dripps DJ, Verderber E, Ng RK, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 receptor antagonist binds to the type II interleukin-1 receptor on B cells and neutrophils// *J Biol Chem.* - 1991. - №266. – p.20311-20315.
 - 85.Drumond MC, Deen WM. Structural determinants of glomerular hydraulic permeability// *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol.).* – 1994. - №266. – p.1–12.
 - 86.Dulin E, Barreno PG, Guisasola MC. Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in a general population// *Cell Stress and Chaperones.* – 2010. - №15. – p.929-937.
 - 87.Emami A, Schwartz JH, Borkan SC. Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney// *Am Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* - 1991. - №260. – p.479–485.
 - 88.Eremina V, Baelde H J, Quaggin SE. Role of the VEGF—a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier// *Nephron Physiology.* – 2007. - №106(2). - p32–p37.
 - 89.Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J. et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy// *New England Journal of Medicine.* – 2008. – 358 (11). – p. 1129–1136.
 - 90.Eremina V, Sood M, Haigh J. et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A

- expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases// *Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – 111 (5). – p. 707–716.
- 91.Fattori E, Della Rocca C, Costa P. et al. Development of progressive kidney damage and myeloma kidney in interleukin-6 transgenic mice// *Blood*. – 1994. - №83. – p.2570–2579.
 - 92.Feng X, Lu TC, Chuang PY, Fang W, Ratnam K, Xiong H. et al. Reduction of Stat3 activity attenuates HIV-induced kidney injury// *J Am Soc Nephrol*. – 2009. - №20. – p.2138–46.
 - 93.Ferris DK, Harel-Bellan A, Morimoto RI, Welch WJ, Farrar WL. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes// *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1988. - №85(11). – p. 3850-3854.
 - 94.Forbes JM, Bonnet F, Russo LM, Burns WC, Cao Z, Candido R, Kawachi H, Allen TJ, Cooper ME, Jerums G, Osicka TM. Modulation of nephrin in the diabetic kidney: association with systemic hypertension and increasing albuminuria// *J of Hypertension*. – 2002. - №20(5). – p.985-992.
 - 95.Fouqueray B, Suberville S, Isaka Y, Akagi Y, Gerard C, Velu T, Imai E, Baud L. Reduction of proteinuria in anti-glomerular basement membrane nephritis by interleukin-10 (IL-10) gene transfer// *J Am Soc Nephrol*. – 1996. - №7. – p.1698
 - 96.Fouquerbay B, Boutard V, Phillipe C, Krnreich A, Marchant A, Perez J, Goldman M, Baud L. Mesangial cell-derived interleukin-10 modulates mesangial cell response to lipopolysaccharide// *Am J Pathol*. – 1995. - №147. – p.176-182.
 - 97.Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is in acute-phase protein// *J Clin Invest*. – 1997. - № 99. – p.2930-2940.
 - 98.Gadliardini E, Benigni A, Tomasoni S, Abbate M, Kalluri R, Remuzzi G. Targeted downregulation of extracellular nephrin in human IgA nephropathy// *Am J Nephrol*. - 2003. - №23. – p.277-286.
 - 99.Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly// *Circ Res*. – 2002. - №90. – p.251–262.

100. Garovic VD, Wagner SJ, Petrovic LM, Gray CE, Hall P, Sugimoto H, Kalluri R, Grande JP. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin but not podocin is decreased in kidney sections from women with preeclampsia// *Nephrol Dial Transplant.* – 2007. - №22. – p.1136-1143.
101. George B, Verma R, Soofi A, Garg P, Zhang J, Park TJ, Giardino L, Ryzhova L, Johnstone D, Wong H, Nihalani D, Salant D, Hanks S, Curran T, Rastaldi M, Holzman L. Crk1/2-dependent signaling is necessary for podocyte foot process spreading in mouse models of glomerular disease// *J Clin Invest.* – 2012. - №122. - p. 674–692.
102. Georgopoulos C, McFarland H. Heat shock protein in multiple sclerosis and other autoimmune diseases// *Immunol Today.* – 1993. - №14(8). – p. 373-375.
103. Gerritsma JS, van Kooten C, Gerritsen AF. et al. Transforming growth factor –beta 1 regulates chemokine and complement production by human proximal tubular epithelial cells// *Kidney Int.* – 1998. - №53. – p. 609-616.
104. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor-beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors// *J Biol Chem.* – 1996. - № 271. - 17779-17784.
105. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+/CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner// *J Exp Med.* – 2005. - №202. – p. 1075-1085.
106. Gohda T, Makita Y, Shike T, Funabiki K, Shirato I, Tomino Y. Dilazep hydrochloride, an antiplatelet drug, inhibits lipopolysaccharide-induced mouse mesangial cell IL-6 secretion and proliferation// *Kidney Blood Press Res.* – 2001. - №24. – p.33–8.
107. Gordon S. Alternative activation of macrophages// *Nat Rev Immunol.* – 2003.

- №3 – p. 23-35.

108. Hahn WH, Cho BS, Kim SK, Kang S. Interleukin-1 cluster gene polymorphism in childhood IgA nephropathy// *Pediatr Nephrol.* - 2009. - №24(7). – p. 1329-1336.
109. Hara A, Wada T, Furuchi K, Sakai N, Kawachi H, Shimizu F, Shibuya M, Matsushima K, Yokoyama H, Egashira K, Kaneko S. Blokade of VEGF accelerates proteinuria via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis// *Kidney Int.* - 2006. - №69 (11). – p. 1986-1995.
110. Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: A novel phenomenon of podocyte injury// *J Am Soc Nephrol.* – 2005. - №16. – p.408–16.
111. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis// *Clin J Am Soc Nephrol.* – 2007. – №2. – p. 231–8.
112. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis// *Nephron.* – 2001. - №89. – p.342–7
113. Hara M, Yanagihara T, Takada T. et al. Podocalyxin on the glomerular epithelial cells is preserved well in various glomerular diseases// *Nephron.* – 1994. - №67. – p. 123–124.
114. Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, van der Zee R, Van Eden W. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation// *Ann Rheum Dis.* – 2006. - №65(3).- p.65–68.
115. Hayakawa K, Meng Y, Hiramatsu N, Kasai A, Yamauchi K, Yao J, Kitamura M. Priming of glomerular mesangial cells by activated macrophages causes blunted responses to proinflammatory stimuli// *J Immunol.* – 2006. -№176. – p.2529-2537.
116. Hightower LE. Heat shock, stress protein, chaperones and proteotoxicity// *Cell.* – 1991. - № 66. – p.191-197.
117. Hirsh MI, Junger WG. Roles of heat shock proteins and $\gamma\delta$ T cells in inflammation// *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2008. - №39. – p. 509-513.

118. Hohenstein B, Colin M, Foellmer C. et al. Autocrine VEGF-VEGF-R loop on podocytes during glomerulonephritis in humans// Nephrology Dialysis Transplantation. – 2010. – 25(10). - p. 3170–3180.
119. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M et al. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis// J Immunol. – 1989. -№143. – p. 3949–3955.
120. Horita Y, Miyazaki M, Koji T. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein-overload nephrosis // Nephrology Dialysis Transplantation. – 1998. – 13 (10). - p. 2519–2528.
121. Horuk R, Huang JJ, Covington M, Newton RC. A biochemical and kinetic analysis of the interleukin-1 receptor. Evidence for differences in molecular properties of IL-1 receptors// J Biol Chem. – 1987. - №262. – p.16275-16278.
122. Hu Y, Ivashkiv LB. Costimulation of chemokine receptor signaling by matrix metalloproteinase-9 mediates enhanced migration of IFN-alpha dendritic cells// J Immunol . – 2006. - №176. – p. 6022–6033.
123. Huber TB, Bensing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function// Curr Opin Nephrol Hypertension. – 2005. - №14 (3). – p. 211-216.
124. Huh W, Kim DJ, Kim M-K, Kim YG, Oh H-Y, Ruotsalainen V, Tryggvason K. Expression of nephrin in acquired human glomerular disease// Nephrol Dial Transplant. – 2002. - №17. – p. 478-484.
125. Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress// Cancer Res. – 1996. - №56. – p.273-279.
126. Hyewon H, Eun YU, Il SA. The Role of MCP 1 and IL 6 on the Progress of Crescentic Glomerulonephritis// The Korean Journal of Nephrology. - 2009. - №28. – p. 326-334.
127. Imai E, Isaka Y, Akagi Y, Kaneda Y. Gene transfer into the glomerulus by hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome method, in Genetic Manipulation of the kidney, edited by Kitamura// M. Exp Nephrol. – 1997. - №5. – p. 112-117.

128. Jan-Stephan FS, van Goor H, Hanemaaijer R, Kallenberg CGM, Stegeman CA. Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis// *Nephrol Dial Transplant.* – 2004. - №19. – p. 1412–1419.
129. Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint// *Kidney Int.* – 2008. - №74. – p. 22–36.
130. Jia J, Ding G, Zhu J, Chen C, Liang W, Franki N, Singhal PC. Angiotensin II infusion induced nephrin expression changes and podocyte apoptosis// *Am J Nephrol.* – 2008. - №28 (3). – p. 500-507.
131. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer// *Journal of Clinical Oncology.* – 2—3. – 21 (1). - p. 60–65.
132. Kalluri R, Danoff TM, Okada H, Neilson EG. Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice// *J Clin Invest.* – 1997. - №100. – p. 2263-2275.
133. Kaneda Y, Morishita R, Tomita N. Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver// *J Mol Med.* – 1995. - №73. – p. 289-297.
134. Karkar AM, Tam FWK, Steinkasserer A, Kurrle R, Langner K, Scallon BJ, Meager A, Rees AJ. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by IL-1ra, soluble IL-1 receptor, and soluble TNF receptor// *Kidney Int.* – 1995. - №48. – p. 1738-1746.
135. Kashihara N, Maeshima Y, Sekikawa T, Okamoto K, Kanao K, Sugiyama H, Makino H, Ota Z, Yasuda T. Inhibition of human mesangial cell proliferation by decoy oligonucleotide targeting the transcription factor NF- κ B (abstract)// *J Am Soc Nephrol.* – 1995. - № 6. – p.834.
136. Kaufmann S.H. Heat shock protein and the immune response// *Immunol Today.* – 1990 - № 11. – p. 129-136.

137. Kawachi H, Iwanaga T, Toyabe S, Oite T, Shimizu F. Mesangial sclerotic change with persistent proteinuria in rats after two consecutive injection of monoclonal antibody 1-22-3// Clin Exp Immunol. – 1992. - №90. – p. 129-134.
138. Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injures// Kidney Int. – 1991. - №40. – p. 291-301.
139. Keeling J, Herrera GA. Human matrix metalloproteinases: characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis// Microsc Res Tech. – 2008. - №71. – p.371–379.
140. Kiberd BA. Interleukin-6 receptor blockage ameliorates murine lupus nephritis// J Am Soc Nephrol. – 1993. – №4. – p. 58 –61.
141. Kim J, Nueda A, Meng Y-H, Dynan WS, Mivechi NF. Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members// J Cell Biochem. – 1997. - №67. – p.43-54.
142. Kim M-G, Jung Cho E, Won Lee J. et al. The heat-shock protein-70-induced renoprotective effect is partially mediated by CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury// Kidney Int . – 2014. - №85. – p. 62–71.
143. Kim YH, Goyal M, Kurnit D. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat// Kidney Int. – 2001. – №60. – p.957–968.
144. Kitamura M. Creation of a reversible on/off system for site-specific in vivo control of exogenous gene activity in the renal glomerulus// Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. - №93. – p. 7387-7391.
145. Kitamura M, Fine LG. The concept of glomerular self-defence// Kidney Int. - 1999 - №85. – p. 62-71.
146. Kitamura M, Burton S, English J, Kawachi H, Fine LG. Transfer of a mutated gene encoding active transforming growth factor- β 1 supresses mitogenesis and IL-1 response in the glomerulus// Kidney Int. – 1995. – 48. – p. 1747-1757.

147. Kitching AR, Katerelos M, Mudge SJ, Tipping PG, Power DA, Holdsworth SR. Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis// Clin Exp Immunol. – 2002. - №128. – p.36-43.
148. Kluth DC. Pro-resolution properties of macrophages in renal injury// Kidney Int. – 2007. - №72. – p. 234-236.
149. Koide H, Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y. Increased mRNA expression of metalloproteinase-9 in peripheral blood monocytes from patients with immunoglobulin A nephropathy// Am J Kidney Dis. – 1996. – №28. – p. 32-39.
150. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells// J Immunol. – 2000. - №164 (1). – p. 13-17.
151. Komatsuda A, Wakui H, Imai H, Nakamoto Y, Miura AB, Itoh H. Renal localization of the constitutive 73-kDa heat shock protein in normal and PAN rats// Kidney Int. – 1992. -№ 41. – p.1204-1212.
152. Komatsuda G, Wakui H, Satoh K, Yasuda T, Imai H, Nakamoto Y, Miura AB, Itoh H, Tashima Y. Altered localization of 73-kilodalton heat-shock protein in rat kidneys with gentamicin-induced acute tubular injury// Lab Invest. – 1993. - №68. – p. 687-695.
153. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, de Heer E, Paul LC, Bruijn JA. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases// J Am Soc Nephrol. – 2003. - №14. – p.2063-2071.
154. Kriz W, Gretz N, Lemley K. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit?// Kidney Int. – 1998. - №54. – p.687–697.
155. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: The enigma of foot process effacement// Am J Physiol Renal Physiol. - 2013. - №304. – p.333–47.
156. Kriz W. Progressive renal failure—Inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis// Nephrol Dial Transplant. -

1996. - №11. – p.1738–1742.
157. Kriz W, Hackenthal E, Nobiling R. et al. A role for podocytes to counteract capillary wall distension// *Kidney Int.* – 1994. - № 45. – p. 369–376.
 158. Kriz W, Kobayashi N, Elger M. New aspects of podocyte structure, function, and pathology// *Clin Exp Nephrol.* – 1998. - № 2. –p. 85–99.
 159. Kubo A, Nishitani Y, Minamino N. et al. Adrenomedullin gene transcription is decreased in peripheral blood mononuclear cells of patients with IgA nephropathy// *Nephron.* – 2000. – 85 (3). – p. 201–206.
 160. Kuga S, Otsuka T, Nihiro H, Nunoi H, Nemoto Y, Nakano T, Ogo T, Umei T, Niho J. Supression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase// *Exp Hematol.* – 1996. – №24. – p.151-157.
 161. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology// *Semin Immunopathol.* – 2007. -№ 29. – p. 317-335.
 162. Lakkis FG, Baddoura FK, Cruet EN, Parekh KR, Fukunaga M, Munger KA. Anti-inflammatory lymphokine mRNA expression in antibody-induced glomerulonephritis// *Kidney Int.* – 1996. – №49. – p.117-126.
 163. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Vannice JL, Atkins RC. Interleukin-1 receptor antagonist halts the progression of established glomerulonephritis in the rat// *Kidney Int.* – 1995. - №47. – p. 1303-1309.
 164. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Zarama M, Vannice JL, Atkins RC. Supression of experimental glomerulonephritis by the interleukin-1 receptor antagonist// *Kidney Int.* – 1993. - №43. –p. 479-485.
 165. Lan HY, Song Q, Nikolic-Paterson DJ, Tesch GH, Mu W, Atkins RC. Combined interleukin-1 and tumor necrosis factor α blockade in rat crescentic anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis// *Nephrology.* – 2008 - №6(5). - p. 214-220.

166. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27// *J Biol Chem.* – 1993. - №268. – p. 24210-24214.
167. Le Hir M, Keller C, Eschmann V, Hähnel B, Hosser H, Kriz W. Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis// *J Am Soc Nephrol.* – 2001. - №12. – p. 2060–2071.
168. Lebherz-Eichinger D, Ankersmit H, Hacker S, Hetz H, Kimberger O, Schmidt EM, Reiter T, Hörl WH, Haas M, Krenn CG, Roth G. HSP27 and HSP70 serum and urine levels in patients suffering from chronic kidney disease// *Clin Chim Acta.* - 2012. -№ 41. – p.282–286.
169. Lee EY, Chung CH, Khoury CC. et al. The monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 loop, inducible by TGF- β , increases podocyte motility and albumin permeability// *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2009. - № 297. – p. 85-94.
170. Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denaturated model substrates and can maintain a substrate in a folding-complement state// *EMBO J.* – 1997. - №16. – p.659-671.
171. Lee SJ, Borsting E, Decleves AE, Singh P, Cunard R. Podocytes express IL-6 and lipocalin 2/ neutrophil gelatinase-associated lipocalin in lipopolysaccharide-induced acute glomerular injury// *Nephron Exp Nephrol.* – 2012. -№121. – p.86–96.
172. Lemley K, Lafayette R, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, Myers B. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy// *Kidney Int.* – 2002. - №61. – p.1475–1485.
173. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in renal development and disease// *J Am Soc Nephrol.* – 2000. - №11. – p. 574–581.
174. Lewko B, Stepinski J. Hyperglycemia and mechanical stress: Targeting the renal podocyte// *J Cell Physiol.* – 2009. - №221(2). – p. 288-295.
175. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4⁺/CD25⁺ T regulatory T cells inhibit neutrophil function and promote

- their apoptosis and death// J Immunol. – 2006. - №177. – p. 7155-7163.
176. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury// Cell. - 2002. - №111. –p. 635-646.
 177. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria// Am J Pathol. - 2008 . – №172(2). – p. 299-308.
 178. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S M, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade// Cell . – 1997. - №91. – p. 479—489.
 179. Liang B, Gardner DB, Griswold DE et al. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus// Immunology. - 2006. - №119. – p. 296 –305.
 180. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+/CD25+ regulatory T cells// J Immunol. – 2005. - №175. – p. 4180-4183.
 181. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins// Annu Rev Genet. – 1998. - № 22, - p. 631-677.
 182. Liu Z, Yang J, Chen Z, Gong R, Li L. Gene polymorphism in IL-1 receptor antagonist affects its production by monocytes in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein nephritis// Chin Med J. - 2001 . - 114(12). – p.1313-1316.
 183. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME. et al. RANTES and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis , but only MCP-1 is involved in crescentic formation and interstitial fibrosis// J. Exp. Med. – 1997. – 185 (7). – p.1371-1380.
 184. Lu H, Zhou J. HBV X gene transfection upregulates IL-1beta and IL-6 gene expression and induces rat glomerular mesangial cell proliferation// J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. – 2008. - №28. – p. 247–50.

185. Lu TC, Wang ZH, Feng X, Chuang PY, Fang W, Shen Y. et al. Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy// *Kidney Int* . – 2009. - №76. – p.63–71.
186. Luimula P, Aaltonen P, Ahola H, Palmen T, Holthofer H. Alternatively spliced nephrin in experimental glomerular disease of the rat// *Pediatr Res*. - 2000. - №48. – p. 759–762.
187. Luttrupp K, Lindholm B, Carrero JJ, Glorieux G, Schepers E, Vanholder R, Schalling M, Stenvinkel R, Nordfors L. Genetics/genomics in chronic kidney disease – towards personalized medicine? // *Seminars in Dialysis*. – 2009. - №22(4). – p. 417-422.
188. Luyckx VA, Brenner BM. The clinical importance of nephron mass// *J Am Soc Nephrol*. – 2010. - №21. – p. 898–910.
189. Lydyard PM, van Eden W. Heat shock proteis: immunity and immunipathology// *Immunol Today*. - 1990; - № 11. – p. 228-229.
190. Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, Anderle SK, Brown RR, Baldwin AS, Haskill JS, Schweb JH. Supression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist cDNA// *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1996. - №93. – p. 402-406.
191. Mansur JB, Sabino AR, Nishida SK, Kirsztajn GM. Is there a role for urinary podocyte excretion assessment in lupus nephritis? // *Ren Fail*. – 2016. - №38(4). – p. 643-7.
192. Mantovani A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization// *Trends Immunol*. – 2004. - №25. – p. 677-686.
193. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age// *Immunity*. – 2005. - №23. – p. 344-346.
194. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation// *Eur J Immunol*. – 2007. - №37. – p. 14-16
195. Mao H, Li Z, Zhou Y, Li Z, Zhuang S, An X, Zhang B, Chen W, Nie J, Wang Z, Borkan SC, Wang Y, Yu X. HSP72 attenuates renal tubular cell apoptosis and

- interstitial fibrosis in obstructive nephropathy// *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2008. - №295. – p.202–214.
196. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization// *Front Biosci.* – 2008. - №13. – p. 453-461.
 197. Marzec L, Zdrojewski Z, Liberek T, Bryl E, Chmielewski M, Witkowski JM, Rutkowski B. Expression of Hsp 72 protein in chronic kidney disease patients// *Scandinavian J Urol and Nephrol.* – 2009. - №43(5). – p. 400-408.
 198. Masutani K, Tokumoto M, Nakashima H. Strong polarization toward Th1 immune response in ANCA-associated glomerulonephritis// *Clin Nephrol.* – 2003. - №59. – p. 395-405.
 199. Matsumoto K, Kanmatsuse K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in the urine of patients with minimal-change nephrotic syndrome// *Clinical Nephrology.* – 2001. – 55(4). - p. 269–274.
 200. Maynard S E, Min JY, Merchan J et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction hypertension, and proteinuria in preeclampsia// *Journal of Clinical Investigation.* – 2003. – 111(5). - p. 649–658.
 201. McMillan JI, Riordan JW, Couser WG, Pollock AS, Lovett DH. Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy// *J Clin Invest.* – 1996. - № 97. – p. 1094 -1101.
 202. Mehlen P, Hickey E., Weber L.A. et al. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generated a protection against TNF α in NIH-3T3-ras cells// *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. - №241. – p.187-192.
 203. Mertz PM, de Witt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 supression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production// *J Biol Chem.* – 1994. - №269. – p. 21322-21329.

204. Mistra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4⁺/CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells// *J Immunol.* – 2004. - № 172. – p. 4676-4680.
205. Mitani O, Katoh M, Shigematsu H. Participation of the matrix metalloproteinase inhibitor in Thy-1 nephritis// *Pathol Int.* – 2004. - №54. – p. 241–250.
206. Miyata M, Sato H., Sato Y. et al. Significance of endogenous heat shock protein in adjuvant arthritis// *J Rheumatol.* – 1999. - №26. – p. 2210-2214.
207. Miyauchi M, Toyoda M, Kobayashi K. Hypertrophy and loss of podocytes in diabetic nephropathy// *Intern Med.* – 2009.- №48. – p.1615–1620.
208. Monarfi N, Gruaz L, Dayer JM, Burger D. Opposite regulation of IL-1 β and secreted antagonist production by phosphatidylinositol-3 kinases in human monocytes activated by lipopolysaccharides or contact with T cells// *J Immunol.* – 2007. - №178. – p. 446-454.
209. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor// *Annu Rev Immunol.* – 2001. - №19. – p. 683-765.
210. Morales-Buenrostro LE, Salas-Nolasco OI, Barrera-Chimal J, Casas-Aparicio G, Irizar-Santana S, Perez-Villalva R, Bobadilla NA Hsp72 is a novel biomarker to predict acute kidney injury in critically ill patients// *PLoS One.* – 2014. - №9(10). - e109407.
211. Morioka Y, Koike H, Ikezumi Y, Ito Y, Oyanagi A, Gejyo F, Shimizu F, Kawachi H. Podocyte exacerbate mesangial proliferative glomerulonephritis// *Kidney Int.* – 2001. - № 60(6). – p.2192-204.
212. Morita K, Wakui H, Komatsuda A, Ohtani H, Miura AB, Itoh H, Tashima Y. Induction of heat-shock proteins HSP73 and HSP90 in rat kidneys after ischemia// *Ren Fail.* – 1995. - №17. – p. 405-419.
213. Mosser DM. The many faces of macrophage activation// *J Leukoc Biol.* – 2003. - №73. – p. 209-212.

214. Moutabarrik A, Nakanishi I, Ishibashi M. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells// Scand J Immunol. - 1994. - №40. – p. 181–6.
215. Mueller T, Bidmon B, Pichler P, Arbeiter K, Ruffingshofer D, van Why SK, Aufricht C. Urinary heat shock protein-72 excretion in clinical and experimental renal ischemia// Pediatr . – 2003. - №18. – p. 97–99.
216. Muller E, Neuhofer W, Ohno A, Rucker S, Thureau K, Beck F-X. Heat shock proteins HSP25, HSP 60, HSP 72, HSP73 in isoosmotic cortex and hyperosmotic medulla of rat kidney// Pflugers Arch. – 1996. - №431. – p. 608-617.
217. Muller-Deile J, Schiffer M. Renal involvement in preeclampsia: similarities to VEGF ablation therapy// Journal of Pregnancy. – 2011. – 2011. - p. 1-6
218. Multhoff G, Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response// Cell Stress and Chaperones. – 1996. - №1. – p. 167–176.
219. Musiał K, Zwolińska D. Hsp27 as a marker of cell damage in children on chronic dialysis// Cell Stress and Chaperones. – 2012. - №17. – p. 675–682.
220. Nagata M, Kriz W. Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis// Kidney Int. – 1992. - №42. - p.148–160.
221. Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin A receptor antagonist on murine lupus nephritis// Kidney Int. – 1995. - №47. – p. 481-489.
222. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K. et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis// Am J Med Sci. – 2000. - №320. – p.112–6.
223. Nakatsue T, Koike ., Han GD, Suzuki K, Miyauchi N, Yuan H, Salant DJ, Gejyo F, Shimizu F, Kawachi H. Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy// Kidney Int. – 2005. - №67. – p. 2239-2253.

224. Neal C, Crook H, Bell E, Harper S, Bates D. Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinct restrictive urinary subpodocyte space//J Am Soc Nephrol. – 2005. - №16(5). – p. 1223-35.
225. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, Shriki A, Rose-John S, Galun E. et al. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury// J Am Soc Nephrol. – 2008. - №1 – p. 91106-15
226. Neuhofer W, Muller E, Burger-Kentischer A, Fraek ML, Thureau K, Beck F-X. Pretreatment with hypertonic NaCl protects MDCK cells against high urea concentration// Pflugers Arch. – 1998. - № 435. – p. 407-414.
227. Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Hill PA, Vannice JL, Atkins RC. Suppression of experimental glomerulonephritis by the interleukin-1 receptor antagonist: Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 expression// J Am Soc Nephrol. – 1994. - №4. – p. 1695-1700.
228. Nishida M, Okumura Y, Fujimoto S, Shiraishi I, Itoi T, Hamaoka K. Adoptive transfer of macrophages ameliorates renal fibrosis in mice// Biochem Biophys Res Commun. – 2005. - №332. - p. 11-16.
229. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease; are intervention possible? //Nephrol Dial Transplant. - 2001. - №17. – p. :363-8.
230. O'Neill S, Ingman TG, Wigmore SJ, Harrison EM, Bellamy CO. Differential expression of heat shock proteins in healthy and diseased human renal allografts// Ann Transplant. - 2013. - №18. – p. 550-557.
231. O'Neill S, Ross JA, Wigmore SJ, Harrison EM. The role of heat shock protein 90 in modulating ischemiareperfusion injury in the kidney// Expert Opin Investig Drugs. - 2012.- №21. – p. 1535–1548.
232. Ohmori Y, Smith MF, Hamilton TA. IL-4-induced expression of the IL-1 receptor antagonist gene is mediated by STAT6// J Immunol. – 1996. - №157. – p.

2058-2065.

233. Olszina DP, Pajkrt D, Lauw FN, van Deventer SJ. Interleukin-10 inhibits the release of CC chemokines during human endotoxemia// *J Infect Dis.* – 2000. - №181. – p. 613-620.
234. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells// *Nat Immunol.* – 2007. - №8. – p.1353-1362.
235. Panzer U, Thaiss F, Zahner G. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and osteopontin differentially regulate monocytes recruitment in experimental glomerulonephritis// *Kidney Int.* – 2001. - №59. – p.1762-1769.
236. Park S-K, Yang WS, Han NJ, Lee SK, Ahn H, Lee IK, Park JY, Lee K-U, Lee JD. Dexamethasone regulates AP-1 to repress TNF- α induced MCP-1 production in human glomerular endothelial cells// *Nephrol Dial Transplant.* – 2004. - №19. – p.312-319.
237. Patari A, Forsblom C, Havana M. et al. Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes// *Diabetes.* – 2003. - №52. – p. 2969-2974.
238. Patel T, Morgan J, Demetri G. et al. A preeclampsialike syndrome characterized by reversible hypertension and proteinuria induced by the multitargeted kinase inhibitors sunitinib and sorafenib // *Journal of the National Cancer Institute.* – 2008. – 100(4). – p. 282–284.
239. Patrakka J, Tryggvason K. New insights into the role of podocytes in proteinuria// *Nat Rev Nephrol.*- 2009. - №5. – p. 463–8.
240. Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikinheimo M, Tryggvason K, Jalanko H. Expression of nephrin in pediatric kidney diseases// *J Am Soc Nephrol.* – 2001. - №12. – p.289-296.
241. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte// *Physiol Rev.* – 2003. - №83. – p. 253–307.
242. Pavenstadt H. Roles of the podocyte in glomerular function// *Am J Physiol.* –

2000. - №278. – p. 173–179
243. Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity// *Nephron Clin Pract.* - 2007. - 106(2). – p.61-6.
244. Petermann AT, Pippin J, Durvasula R, Pichler R, Hiromuda K, Monkawa T, Couser WG, Shankland SJ. Mechanical stretch induces podocyte hypertrophy in vitro// *Kidney Int.* – 2005 - №67(1). – p.157-66
245. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response// *Lancet.* -2003. - №362. – p. 469-476.
246. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. Identification of heat shock protein 60 (HSP 60) and anti-HSP60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals// *Cell Stress Chaperones.* – 1999. - №4. – p. 29-35.
247. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (HSP 70) and anti-HSP70 antibodies in the serum of normal individuals// *Immunol Invest.* - 1998. - №27. – p.367-377.
248. Pollak MR. Inherited Podocytopathies: FSGS and Nephrotic Syndrome from a Genetic Viewpoint// *J Am Soc Nephrol.* - 2002. - №13. – p.3016–3023.
249. Preville X, Schultz H, Knauf U. et al. Analysis of the role of Hsp25 phosphorylation reveals the importance of the oligomerization state of this small heat shock protein in its protective function against TNF- α and hydrogen peroxide-induced cell death// *J Cell Biochem.* – 1998. - №69. – p. 436-452.
250. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, Klar-Mohamad N. et al. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells// *Kidney Int.* - 1995. - №48. – p.1477-1486.
251. Rachmawati H, Beljaars L, Reker-Smit C, Bakker Hi, Van Loenen-Weemaes Am, Meijer Dkf, Poelstra K. Intravenous administration of recombinant human il-10 suppresses the development of anti-thy 1-induced glomerulosclerosis in rats// *PDA J Pharm Sci Technol.* – 2011. - №65(2). – p.116-30.

252. Ranganathan P, Jayakumar C, Ramesh G. Proximal tubule-specific overexpression of netrin-1 suppresses acute kidney injury-induced interstitial fibrosis and glomerulosclerosis through suppression of IL-6/STAT3 signaling// *Am J Physiol Renal Physiol*. – 2013. - №304. – p.1054–65.
253. Rao DV, Watson K, Jones GL. Age-related attenuation in the expression of the major heat shock proteins in human peripheral lymphocytes// *Mech Ageing*. - 1999. - №107. – p.105-118.
254. Rauta V, Teppo A-M, Tornroth T, Honkanen E, Gronhagen-Riska C. Lower urinary interleukin-1 receptor antagonist excretion in IgA nephropathy than in Henoch-Schonlein nephritis// *Nephrol Dial Transplant*. – 2003. - №18. – p.1785-1791.
255. Reidy K, Susztak K. Epithelial-mesenchymal transition and podocyte loss in diabetic kidney disease// *Am J Kidney Dis*. – 2009. - №54. – p.590–593.
256. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi M, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe A, Kreidberg J, Mundel P. Induction of B7–1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome// *J Clin Invest*. – 2004. - №113. – p. 1390–1397.
257. Reuter A, Nestl A, Zwacka RM, Tuckermann J, Waldherr R, Wagner EM, Hoyhtya M, Meyer GA, Angel P, Weiher H. Expression of the recessive glomerulosclerosis gene Mpv17 regulates MMP-2 expression in fibroblasts, the kidney, and the inner ear of mice// *Mol Biol Cell*. – 1998. - №9. – p. 1675–1682.
258. Roberto P-F, Lindholm B, Axelsson J, Stenvinkel P. Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure// *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2003. – 18(6). – p. 1042–1045.
259. Roderick JT, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases // *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. - 2012. – 302(11). –

p. 1351-1361

260. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse// J Cell Biol. – 1974. - №60. - p.423-433.
261. Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. Renal progenitors: An evolutionary conserved strategy for kidney regeneration// Nat Rev Nephrol. – 2013. - №9. – p.137–46.
262. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P. et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment// Immunity. – 1997. - №6. – p.315–25.
263. Ronco P, Chatziantoniou C. Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives// Kidney Int. - 2008. - №74. – p.873–878.
264. Ronco P, Lelongt B, Piedagnel R, Chatziantoniou C. Matrix metalloproteinases in kidney disease progression and repair: a case of flipping the coin// Semin Nephrol. – 2007. - №27. – p.352–362.
265. Sadeghi M, Daniel V, Naujokat C, Weimer R, Opelz G. Strikingly higher interleukin (IL)-1 α , IL-1 β and soluble interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1ra) but similar IL-2, sIL-2r, IL-3, IL-4, IL-6, sIL-6r, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , transforming growth factor (TGF)- β 2 and interferon IFN- γ urine levels in healthy females compared to healthy males: protection against urinary tract injury?// Clin Exp Immunol. – 2005. - №142. – p. 312-317.
266. Samson J.N. Regulation of antigen-specific regulatory T-cell induction via nasal and oral mucosa// Crit Rev Immunol. – 2004. - №24. – p. 157-177.
267. Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Sanchez-Lopez E, Ruiz-Ortega M, AlbertoBenito-Martin A, Saleem MA, Mathieson PW, Mezzano S, Egido J, Ortiz A. HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II// Laboratory Investigation. – 2012. - №92. – p. 32–45.
268. Saran AM, Yuan H, Takeuchi E, McLaughlin M, Salant DJ. Complement

- mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy// *Kidney Int.* – 2003. - №64. – p. 2072-2078.
269. Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M. et al. Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease// *J Am Soc Nephrol.* - 2009. - №20. – p. 1041–52.
 270. Scheffold A, Murphy KM, Hofer T. Competition for cytokines: T(reg) cells take all// *Nat Immunol.* – 2007. - №8. – p. 1285-1287.
 271. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7// *J Clin Invest.* – 2001. - №108. – p.807–816.
 272. Schneider A, Panzer U, Zahner G. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta// *Kidney Int.* – 1999. - №56(1). – p. 135-144.
 273. Schober A, Burger-Kentischer A, Muller E, Beck F-X. Effect of ischemia on localization of heat shock proteins in kidney// *Kidney Int.* – 1998. – 54. – p. 174-176.
 274. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology// *Kidney International.* – 2004. – 65(6). - p. 2003–2017.
 275. Sedor JR, Nakazato Y, Konieczkowski M. Interleukin-1 and the mesangial cell// *Kidney Int.* – 1992. - №41. – p. 595-599.
 276. Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Either F, Mack M, Schlondorff D, Alpers CE. Expression of the Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein -1 and its Receptor Chemokine Receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis// *J Am Soc Nephrol.* – 2000. - №11. – p.2231-2242.
 277. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T. Podocyte as the target for aldosterone. Role of oxidative stress and Sgk1// *Hypertension.* – 2007. - № 49. – p. 355-364.
 278. Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis// *Am J*

- Pathol. – 1996. – 148. – p.1283–1296.
279. Shirato I. Podocyte process effacement in vivo// *Micros Res Tech.* – 2002. - №57. – p. 241–246.
 280. Shulman K. et al. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular disease // *J Am Soc Nephrol.* – 1996. - №7. – p. 661-666.
 281. Simon M, Grone HJ, Johren O. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney// *American Journal of Physiology.* – 1995. – 268 (2). - p. 240–250.
 282. Simon M, Rockl W, Hornig C. et al. Receptors of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in fetal and adult human kidney: localization and [125I]VEGF binding sites// *Journal of the American Society of Nephrology.* -1998. – 9(6). – p. 1032–1044.
 283. Smith MF, Eidlen D, Arend WP, Gutierrez-Hartmann A. LPS-induced expression of the human IL-1 receptor antagonist gene is controlled by multiple interacting promoter elements// *J Immunol.* – 1994. - №153. – p. 3584-3593.
 284. Smoyer WE, Gupta A, Mundel P, Ballew JD, Welsh MJ. Altered expression of glomerular heat shock protein 27 in experimental nephrotic syndrome// *J Clin Invest.* – 1996. – №97. – p. 2697-2704.
 285. Smoyer WE, Ranson RF. Hsp27 regulates podocyte cytoskeletal changes in an in vitro model of podocyte process retraction// *FASEB J.* – 2002. - №16. – p.316-326.
 286. Srivastava T, Sharma M, Yew KH, Sharma R, Duncan RS, Saleem MA. et al. LPS and PAN-induced podocyte injury in an in vitro model of minimal change disease: changes in TLR profile// *J Cell Commun Signal.* – 2013. - №7. – p.49–60.
 287. Steinmann-Niggli K, Ziswiler R, Kung M, Marti HP. Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates anti-Thy1.1 nephritis// *J Am Soc Nephrol.* – 1998. - №9. – p. 397–407.

288. Stenvinkel P, Ketteler M, Jonson JR, Lindholm B. et al. IL-10, IL-6 and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia – The good, the bad, and the ugly// *Kidney Int.* – 2005. - № 67. – p. 1216-1233.
289. Stephan M, Conrad S, Eggert T. et al. Urinary concentration and tissue messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 as an indicator of the degree of hydronephrotic atrophy in partial ureteral obstruction// *J Urol.* - 2002. - №167. – p.1497-1502.
290. Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2// *J Exp Med.* – 1994. – 180. – p. 2365-2370.
291. Sturfelt G, Roux-Lombard P, Wollheim FA, Dayer J-M. Low levels of interleukin-1 receptor antagonist coincide with kidney involvement in systemic lupus erythematosus// *British J Rheumatology.* – 1997. - №36. – p.1283-1289.
292. Suberville S, Bellocq A, Fouqueray B, Philippr C, Lantz O, Perez J, Baund L. Regulation of interleukin-10 production by β -adrenergic agonists// *Eur J Immunol.* . – 1996. - №26. - p.2601-2605.
293. Sugimoto H, Hamanog Y, Charytan D. et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt1) induces proteinuria// *Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – 278 (15). - p. 12605–12608.
294. Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B. et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney// *Kidney Int.* – 2000. – 58. – p.1664-1676.
295. Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells// *Hum Immunol.* – 200. - №66. – p. 222-230.

296. Tam FM, Karkar AM, Smith J, Yoshimura T, Steinkasserer A, Kurrle R, Langner K, Rees AJ. Differential expression macrophage inflammatory protein-2 and monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glomerulonephritis// *Kidney Int.* – 1996. - №49. – p. 715-721.
297. Tam FWK, Smith J, Cashman SJ, Wang Y, Thompson EM, Rees AJ. Glomerular expression of interleukin receptor antagonist and interleukin-1 β genes in antibody-mediated glomerulonephritis// *Am J Pathol.* – 1994. - №145. – p. 126-136.
298. Tan TK, Zheng G, Hsu TT, Wang Y, Lee VW, Tian X, Wang Y, Cao Q, Wang Y, Harris DC. Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells// *Am J Pathol.* – 2010. - №176.- p. 1256–1270.
299. Tarabra E, Giunti S, Barutta F, Salvidio G, Burt D, Deferrari G, Gambino R, Vergola D, Pinach S, Perin PC, Camussi G, Gruden G. Effect of the monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine receptor 2 system on nephrin expression in streptozotocin-treated mice and human cultured podocytes// *Diabetes.* – 2009. - 58(9). – p. 2109-18.
300. Tesh GN, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Role of interleukin-1 in mesangial proliferation and matrix deposition in experimental mesangioproliferative nephritis// *Am J Pathol.* – 1997. - №151. – p.141-150.
301. Tipping PG, Kitching AR, Huang XR, Mutch DA, Holdsworth SR. Immune modulation with interleukin-4 and interleukin-10 prevent crescent formation and glomerular injury in experimental glomerulonephritis// *Eur J Immunol.* - 1997. - №27. – p.530-537.
302. Topham PS, Haydar SA, Kuphal R. et al. Complement-mediated injury reversibly disrupts glomerular epithelial cell actin microfilaments and focal adhesion// *Kidney Int.* – 1999. - №55. – p. 1763-1775.
303. Trieb K, Blahovec H, Margreiter R, Dirnhofer S, Krumböck N, Feichtinger H, Sgonc R. Heat shock protein expression in the transplanted human kidney//

- Transplant International. – 2005. - №14(5). – p. 281-286.
304. Trimarchi H. Podocyturia: what is in a name? //J Transl Int Med. – 2015. - №3(2). – p. 51-56.
 305. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: Nephlin a key component of the slit diaphragm// J Am Soc Nephrol. – 1999. - №10. – p. 2440-2445.
 306. Tryggvason K, Heikkila P, Pettersson E, Tibell A, Thorner P. Can Alport syndrome be treated by gene therapy? //Kidney Int. – 1997. - №51. – p.1493-1499.
 307. Tsagalis GC, Nikolopoulou N, Sotsiou F, Hadjiconstantinou V. The expression of heat shock proteins 27 and 70 in lupus nephritis// Hospital Chronicles. - 2006. - №1(3). – p.125-129.
 308. Tytell M, Greenberg SG, Lasek RJ. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon// Brain Res. - 1986. - №363. – p.161–164.
 309. Urushihara M, Kagami S, Kuhara T, Tamaki T, Kuroda Y. Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis// Nephrol Dial Transplant. – 2002. - №17. – p.1189–1196.
 310. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning KJ, Hacker H, Wagner H. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/ interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells// J Biol Chem. – 2001. - 276(33). – p. 31332-31339.
 311. van Eden W, Tholet JER, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JDA, Hensen EJ, Cohen IR. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocyte in adjuvant arthritis// Nature. – 1988. - №331. – p. 171– 173.
 312. van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation// Nature. - 2005. - №5. – p. 318-330.
 313. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation// J Leukoc Biol. – 2007. -№82(6). – p.1375-81.
 314. van Why SK, Hildebrandt F, Ardito T, Mann AS, Siegel NJ, Kashgarian M.

- Induction and intracellular localization of HSP-72 after renal ischemia// *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte* . – 1992. - 263. – p. 769–775.
315. Venkateshan VS, Marquet E. Heat shock protein 72/73 in normal and diseased kidneys// *Nephron*. – 1996. - №73. – p. 442-449.
 316. Vidyasagar A, Reese S, Hafez O, Huang L-J, Swain W, Jacobson L, Torrealba J, Chammas P-E, Wilson NA, Djamali A. Tubular expression of heatshock protein 27inhibits fibrogenesis inobstructive nephropathy// *Kidney Int*. – 2013. - №83. – p. 84–92.
 317. Viedt C, Dechend R, Fei J, Hansch GM, Kreuzer J, Orth SR. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor kB and Activating protein-1// *J Sm Soc Nephrol*. - 2002. - №13. – p.1534-1547.
 318. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry// *Circ Res*. – 2003. - №92. – p 827–839.
 319. Voellmy R. Transduction of the stress signal and mechanisms of transcriptional regulation of heat shock /stress protein gene expression in higher eukaryotes// *Crit Rev Eukariot Gene Expr*. – 1994. - №4. – p. 357-401.
 320. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease// *Am J Physiol Renal Physiol*. - 2003. - №285(1). – p. 40-8
 321. Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K. Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1)// *FASEB J*. - 1996. - 10(12). – p. 1418-25.
 322. Wada T, Yokoyama H, Su S, Mukaida N, Ivano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi K, Matsushima K. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating

- factor reflects disease activity of lupus nephritis// *Kidney Int.* - 1996. - №49. – p. 761–767.
323. Wada T, Furuichi K, Sakai N. et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy// *Kidney Int.* – 2000. - №58. –p. 1492-1499.
 324. Wada T, Furuichi K, Segawa C, Shimizu M, Sakai N, Takeda S. et al. MIP-1 α and MCP-1 contribute crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis// *Kidney Int.* – 1999. - №56. – p. 995-1003.
 325. Wada T, Yokoyama H, Su S, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi K, Matsushima K. Monitoring urinary levels of Monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis// *Kidney Int.* – 1996. - № 49. – p. 761-767.
 326. Wahl SM, Costa GL, Corcoran M, Wahl LM, Berger AE. Transforming growth factor- β mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist// *J Immunol.* – 1993. - №150. – p. 3553-3560.
 327. Wang G, Lai FM, Kwan BC, Lai KB, Chow KM, Szeto CC. Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis// *Am J Hypertens.* – 2009. - №;22(3). – p. 300-6.
 328. Wang P, Wu P, Siegel MI. et al. Interleukin-10 (IL-10) inhibits nuclear factor kappa B (NF κ B) activation in human monocyte// *J Biol Chem.* – 1995. -№ 270. – p. 9558-9563.
 329. Wang Y, Wang YP, Zheng G, Lee VWS, Ouyang L, Chang DHH, Mahajan D, Coombs J, Wang YM, Alexander SI, Harris DCH. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease// *Kidney Int.* – 2007. – №72. – p. 290-299.
 330. Wang Y, Rangan GK, Tay YC. et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor kB in proximal tubule cells// *J*

- am Soc Nephrol. – 1999. - №10. – p. 1204-1213.
331. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Role of CD8+ cells in the progression of murine adriamycin nephropathy// *Kidney Int.* – 2001.- № 59. – p. 941-949.
 332. Wang Z, Gall JM, Bonegio RG, Havasi A, Hunt CR, Sherman MY, Schwartz JH, Borkan SC. Induction of heat-shock protein 70 inhibits ischemic renal injury// *Kidney Int.* – 2011. - №79. –p. 861–870.
 333. Wang Z, Jin H, Li C, Hou Y, Mei Q, Fan D. Heat shock protein 72 protects kidney proximal tubule cells from injury induced by triptolide by means of activation of the MEK/ERK pathway// *International J of Toxicology.* – 2009. – №3. – p.177–189.
 334. Wanidvoranun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor- α in human monocyte IL-10 synthesis// *J Immunol.* – 1993. - №151. – p.6853-6861.
 335. Welsh GI, Saleem MA. Nephrin—signature molecule of the glomerular podocyte? // *J Pathol.* – 2010. - №220. – p. 328–337.
 336. Wilson HM, Chettibi S, Jobin C, Walbaum D, Rees AJ, Kluth DC. Inhibition of macrophage nuclear factor-kappa B leads to a dominant antiinflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation in vivo// *Am J Pathol.* – 2005. - №167. – p. 27-37.
 337. Wilson HM, Stewart K, Brown PA, Anegon I, Chettibi S, Rees AJ, Kluth DC. Bone-marrow-derived macrophages genetically modified to produce IL-10 reduce injury in experimental glomerulonephritis// *Mol Ther.* – 2002. - № 6. – p. 710-717.
 338. Wilson HM, Walbaum D, Rees AJ. Macrophages and the kidney// *Curr Opin Nephrol Hypertens.* – 2004. - №13. – p. 285-290.
 339. Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Castl G, Tilg H, Mayer G, Gunsilius E, Rosenkranz AR. CD4+/CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice// *J Am Soc Nephrol.* – 2005. - №16. – p. 1360-1370.

340. Wu T, Tanguay RM. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe?//Cell Stress and Chaperones. - 2006. - №11(1). – p. 1-12.
341. Xu L, Yang H-C, Hao C-M, Lin S-T, Gu Y, Ma J. Podocyte number predicts progression of proteinuria in IgA nephropathy// Modern Pathology. – 2010. - №23. – p. 1241–1250.
342. Xu X, Jackson PL, Tanner S, Hardison MT, Abdul Roda M, Blalock JE, Gaggar A. A self-propagating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) dependent cycle of chronic neutrophilic inflammation// PLoS One. -2011. – 6 (1). – p.1-12.
343. Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D. Epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy// Am J Kidney Dis. – 2009. - №54. – p. 653–664.
344. Yang JC, Haworth L, Sherry RM. et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer// New England Journal of Medicine. – 2003. – 349(5). - p. 427–434.
345. Yang J, Reutzel-Selke A, Steier C, Jurisch A, Tullius ST, Sawitzki B, Kolls J, Volk H-D, Ritter T. Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40 and vIL-10ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression IFN-gamma accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model// J Am Soc Nephrol. – 2003. - №14. – p. 214-225.
346. Yen JH, Khayrullina T, Ganea D. PGE₂-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration// Blood. -2008. - №111. – p. 260–270.
347. Yilmaza A, Gedikbasib A, Yildirima ZY, Pehlivanogluc C, Sekerc B, Sucua A, Bundakd R, Emrea S. Higher urine heat shock protein 70/creatinine ratio in type 1 diabetes mellitus// Ren Fail. – 2016. - №38. – p. 404–410.
348. Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Kojima Y, Imasawa T, Kogure T, Hisada Y, Okabe M, Eto Y, Kawamura T, Hosoya T. Prophylaxis of antibody-induced acute glomerulonephritis with genetically modified bone marrow-derived vehicle

- cells// Hum Gene Ther. – 1999. - №1. – p. 2673-2678.
349. Yokoo T, Kitamura M. Gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist into the renal glomerulus via a mesangial cell receptor// Biochem Biophys Res Commun. – 1996. - № 226. – p. 883-888.
 350. Yokoo T, Kitamura M. IL-1 β depressed expression of the 70-kilodalton heat shock protein and sensitizes glomerular cells to oxidant-initiated apoptosis// J Immunol. – 1997. - №272. – p. 18033-18037.
 351. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury// Kidney Int. – 1990. - № 38. – p. 282-288.
 352. Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria// J Am Soc Nephrol. – 2005. - №16. – p.1733–41.
 353. Yuan HT, Tipping P G., Li XZ, Long DA, Woolf AS. Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis// Kidney International. – 2002. – 61 (6). - p. 2078– 2089.
 354. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy// J Am Soc Nephrol. – 2002. - №13. – p. 946-956.
 355. Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, HersHKoviz R, Cohen IR, Lider O. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines// J Immunol. – 2005. - №174. – p.3227-3236.
 356. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhanced CD4+CD25+regulatory T cell function via innate TLR2 signaling// J Clin Invest. – 2006. - №116. – p. 2022-2032.
 357. Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, Cosgrove D, Rougier JP, Werner MC, et al. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease// PLoS Med. – 2006. - №3 (4). – p. 535-546.

358. Zhang X, Xu Z, Zhou L. et al. Plasma levels of Hsp 70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of coronary syndrome// *Cell Stress and Chaperones*. – 2010. - №15. – p. 675-686.
359. Zhang XL, Topley N, Ito T, Phillips A. Interleukin-6 regulation of transforming growth factor (TGF)-beta receptor compartmentalization and turnover enhances TGF-beta1 signaling// *J Biol Chem*. – 2005. - №280. – p.12239-12245.
360. Zhipeng W, Li L, Qibing M, Linna L, Yuhua R, Rong Z. Increased expression of heat shock protein (HSP)72 in a human proximal tubule cell line (HK-2) with gentamicin-induced injury// *J Toxicol Sci*. – 2006. - №31. – p 61–70.
361. Zwiech R, Kacprzyk F, Szuflet A, Nowicki M. Prognostic values of serum concentration and urinary excretion of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor receptors type I and II in patients with IgA nephropathy// *Pol Arch Med Wewn*. – 2005. - №113(4). – p. 326-333.