

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Научные консультанты:

доктор медицинских наук
доктор медицинских наук,
профессор

Бобкова Ирина Николаевна

Лысенко Лидия Владимировна

Официальные оппоненты:

Смирнов Алексей Владимирович: доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, НИИ нефрологии, директор;

Волгина Галина Владимировна: доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, кафедра нефрологии ФДПО, профессор кафедры;

Прокопенко Елена Ивановна: доктор медицинских наук, ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», кафедра трансплантологии, нефрологии и искусственных органов факультета усовершенствования врачей, профессор кафедры.

Ведущая организация: ФГОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.040.05 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу: 119034, Москва, Зубовский бульвар 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Брагина Анна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В изучении проблемы хронического гломерулонефрита (ХГН) одно из центральных мест занимает уточнение механизмов реализации воспаления в почке как патофизиологической основы клинической активности ХГН, информативным признаком которого традиционно считают протеинурию (ПУ) и нефротический синдром (НС) [Мухин Н.А. и соавт. 2012, McCloskey O и Maxwell AP. 2017]

По современным представлениям развитие протеинурии тесно связано с дисфункцией подоцитов – ключевых компонентов гломерулярного барьера. Уточнены многие структурно-функциональные изменения подоцитов, ведущие к массивной потере белка с мочой и формированию НС [Kriz W. и соавт. 1994, 1998; Pavenstadt H. 2000, Pavenstadt H. 2000, Wickman L. и соавт. 2013]. В эксперименте на животных моделях гломерулонефрита и в культуре гломерулярных клеток показано, что повреждение подоцитов сопровождается изменением их формы, распластыванием, апоптозом, отделением от БМК и слущиванием в мочу с появлением в ней целых клеток (подоцитурия) и структурных подоцитарных белков, в частности белка щелевой диафрагмы нефрина (нефринурия) [Hara M. и соавт. 2001, 2005, 2007, Nakamura T. и соавт. 2000, Trimarchi H. 2017, Asfahani RI. и соавт. 2018]. В результате этих изменений происходит потеря общей массы подоцитов в клубочке, что при их ограниченной способности к пролиферации ведет к развитию подоцитопении и склероза [Kriz W. и соавт. 1994, 1998, Trimarchi H. и соавт. 2017].

С другой стороны, повреждение подоцитов при ХГН сопровождается активацией механизмов, противодействующих повреждению на уровне отдельных клеток и почечных структур в целом, объединенных понятием «система самозащиты» почки. Несостоятельность этих механизмов во многом определяет темпы прогрессирования заболевания почек ХГН [Tsagalis G.C, 2006, Smoyer W.E., Gupta A. 2002, Traxler D. и соавт. 2017]. В эксперименте показано, что нарушения в «системе самозащиты почки» сопряжены с дисфункцией протективных белков теплового шока (БТШ), дисбалансом про- и противовоспалительных цитокинов, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, факторов апоптоза и выживаемости клеток ткани почек, в том числе подоцитов [Wada T. 1999, Kiberd BA и соавт. 1993, Lee SJ 2012, Ronco P 2007, Hohenstein B. 2010, Baijnath S. и соавт. 2018].

Подоцит является связующим звеном в реакциях ремоделирования тубуло-интерстиция, не только за счет нефротоксического действия протеинурии, но также через приобретение тубулярными эпителиальными клетками провоспалительного и профиброгенного фенотипа. Предполагают, что в основе прогрессирования гломерулосклероза и тубуло-

интерстициального фиброза лежат процессы эпителиально-мезенхимальной трансдифференциации, опосредованные системой матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов [Cheng S и соавт. 2003, Tan TK и соавт. 2010, Ling L. и соавт. 2018].

В клинических условиях взаимодействие систем повреждения и «самозащиты почки» на разных этапах течения ХГН исследованы недостаточно. Между тем изучение этих вопросов имеет важное значение не только для понимания механизмов прогрессирования ХГН, но и для разработки методов таргетного воздействия на ключевые медиаторы повреждения и защиты с целью уменьшения ПУ и торможения развития почечной недостаточности.

Степень разработанности темы

Изучение роли подоцитов в механизмах развития ПУ и поиск информативных маркеров подоцитарной дисфункции является предметом изучения в последние годы. Исследователи из Германии Vogelmann SU и соавт. (2003г.) одними из первых оценили экскрецию специфических подоцитарных белков (подокаликсина, синаптоподина, фактора опухоли Вильмса WT-1) и установили увеличение их количества в моче больных ХГН. Наиболее интенсивно эти вопросы изучались группой исследователей из Японии [Nakamura T. И соавт. 2000, Hara M. и соавт. 2001,2005,2007, Sato Y. и соавт. 2009], которые показали, что экскреция с мочой подоцитов и их структурных белков увеличивается при активных формах нефрита. В еще более ранних исследованиях Kriz W. и соавт. (1994 и 1998гг.) продемонстрировали, что уменьшение числа подоцитов в кубочках почек (более 40% от их общего количества) приводит к необратимому повреждению гломерулярного фильтра и усиливает процессы гломерулосклероза.

В эти же годы Kitamura M. (1999г.) сформулировал концепцию «самозащиты почки», согласно которой в ткани почки существует многоуровневая система, противодействующая повреждению, при этом универсальными защитными факторами являются БТШ. Однако роль БТШ при различных заболеваниях почек изучена недостаточно. Основная часть исследований касалась изучения экспрессии БТШ в ткани почки при остром почечном повреждении [Harrison 2008, Zang 2008, Guo 2014, Ortega-Trejo JA и соавт. 2015, O'Neill и соавт. 2015], и лишь единичные работы были посвящены изучению экспрессии БТШ в ткани почки, частности БТШ-70 при ХГН [Venkateshan 1996, Tsagalis 2006]. Оценка экскреции БТШ-70 с мочой и уровня циркулирующих антител к БТШ70 в сыворотке крови у больных ХГН ранее не проводилась.

В целом, изучение маркеров подоцитарного повреждения проводилось в основном в эксперименте, в клинических условиях у больных ХГН исследования этого направления носили фрагментарный характер, не оценивалась взаимосвязь выраженности дисфункции

подоцитов с клинико-морфологическими признаками активности/тяжести нефрита, ответом на иммуносупрессивную терапию, общим и почечным прогнозом, характером изменений в системе «самозащиты почки».

Цель и задачи исследования

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

Задачи исследования

У больных ХГН, клинически характеризующимся преимущественно ПУ и НС (протеинурические формы), 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 процессов выживаемости и апоптоза подоцитов, оцененных 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 – БТШ-70 в моче и почечной ткани, наряду с измерением уровня антител к БТШ-70 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 – антагониста рецептора интерлейкина 1 (ИЛ-1ра), тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы 2 (ТИМП-2), интерлейкина-10 (ИЛ-10), количества в клеточных интерстициальных инфильтратах почки регуляторных Т-клеток и уровня в моче провоспалительных факторов – моноцитарного хемотаксического протеина 1 (MCP-1), ИЛ-6, металлопротеиназы-2 и 9 (ММП-2, ММП-9);
5. Определить информативность изученных показателей повреждения подоцитов и «системы самозащиты почки» для прогнозирования ответа на иммуносупрессивную терапию; оценить эффекты применения конкурентного антагониста MCP-1, таргетно

воздействующего на подоцитарные механизмы ПУ.

Научная новизна

Впервые в клинических условиях у больных активными протеинурическими формами ХГН проведена комплексная оценка подоцитарного повреждения на основании определения нефринурии и подоцитурии, степени апоптоза подоцитов по уровню экскреции с мочой каспазы-9 и фактора выживаемости подоцитов - VEGF, а также пула гломерулярных подоцитов в ткани почки. Выявлена четкая взаимосвязь мочевых маркеров повреждения подоцитов с клиническими признаками активности/тяжести ХГН (выраженностью ПУ, НС, дисфункции почек), а также со степенью выявляемой при морфометрии подоцитопении – важной детерминанты развития и прогрессирования гломерулосклероза.

Впервые в клинических условиях в ткани почки, моче, сыворотке крови больных протеинурическими формами ХГН в сопоставлении с провоспалительными факторами (МСР-1, ИЛ-6, ММП-2 и ММП-9) изучен широкий спектр факторов «системы самозащиты почки» (БТШ-27, БТШ-70, противовоспалительные ИЛ-10, ИЛ1-ра, ТИМП).

Впервые у больных ХГН, помимо функции внутриклеточной защиты, оценены внеклеточные протективные эффекты БТШ-70 по уровню циркулирующих антител к этому белку, количеству в интерстициальных инфильтратах ткани почек Т-регуляторных клеток, продуцирующих противовоспалительный ИЛ-10. Выявлено ослабление иммунорегуляторного действия БТШ-70 у больных ХГН по мере нарастания НС и присоединения почечной недостаточности.

Впервые подтверждена возможность использования показателей подоцитарного повреждения для прогнозирования течения и эффективности терапии ХГН. Показано, что выявление высоких показателей подоцитурии и нефринурии, низких показателей VEGF в моче и антител к БТШ-70 в сыворотке крови имеет неблагоприятное прогностическое значение, указывая на тяжесть подоцитарного повреждения, риск развития подоцитопении, торпидного течения НС, резистентности к проводимой стандартной иммуносупрессивной терапии.

Впервые в России у больных с активным течением ХГН использован препарат (пептид X МСР-1), действие которого направлено на ингибирование эффектов МСР-1, в том числе, на подоцитарную дисфункцию. Полученный с помощью этого препарата антипротеинурический эффект создает предпосылки для дальнейшей разработки антицитокиновых лекарственных средств, предназначенных для снижения ПУ.

Теоретическая и практическая значимость

В клинических условиях на достаточной выборке больных с разной клинической активностью и разными морфологическими вариантами ХГН:

Подтверждено значение повреждения подоцитов как универсального механизма развития ПУ и НС. Теоретически обоснованы и практически апробированы информативные воспроизводимые тесты неинвазивной оценки выраженности подоцитарного повреждения с помощью мочевых тестов (определение нефринурии, подоцитурии, уровня экскреции VEGF), позволяющие мониторировать изменения в клубочках почек, оценивать риск развития гломерулосклероза.

Показано, что течение патологического процесса в почке при ХГН определяется балансом локально действующих повреждающих факторов и противостоящих им механизмов самозащиты почки, среди которых особое место занимают белки теплового шока, противовоспалительные цитокины, антиапоптотические факторы; подтверждено, что несостоятельность защитных механизмов определяет темпы прогрессирования ХГН. Разработан неинвазивный метод оценки локально-почечных механизмов самозащиты почки с помощью мочевых и сывороточных тестов, выделен спектр наиболее информативных биомаркеров (уровень циркулирующих антител к БТШ-70, показатель экскреции с мочой БТШ-70, ИЛ-10 и др.) для прогнозирования течения ХГН и его ответа на лечение.

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 ХГН.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У больных с активными протеинурическими формами ХГН пропорционально степени клинической активности/тяжести заболевания выявляются признаки подоцитарного повреждения, 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 в клубочках почек. Применение конкурентного антагониста MCP-1 оказывает выраженный антипротеинурический эффект у больных активными протеинурическими формами ХГН, что подтверждает эффективность блокады MCP-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, научно-исследовательского отдела «Здоровьесберегающие технологии» НИЦ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), 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., XXIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Теория и практика клинической лабораторной диагностики», март 2018г.

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 межклинической лаборатории ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (зав. – Е.П.Гитель), за что автор выражает глубокую благодарность врачу лаборатории иммунологии А.Г.Серовой, изучение биопсийного материала выполнено при участии профессора В.А. Варшавского на кафедре патологической анатомии.

Личный вклад автора

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: теоретическом обосновании (поиске и анализе литературы по теме диссертации), определении цели, задач, организации исследования, отборе пациентов, клиническом обследовании, формировании базы данных, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, написании глав диссертационной работы, формулировке выводов и практических рекомендаций, подготовке основных публикаций по результатам исследования. Автором освоены методики определения исследуемых факторов в моче, сыворотке крови и ткани почки (иммуноферментный анализ, цитофлуометрический метод, иммуногистохимический метод исследования биоптатов).

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 ФГАОУ ВО 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, имеется 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 210 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы исследования», «Результаты собственного исследования», «Обсуждение результатов исследования», заключения, выводов, практических рекомендаций, приложения 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.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

Общая характеристика обследованных больных

Обследовано 159 больных ХГН, клинически протекающего преимущественно с ПУ и НС (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, Университетская клиническая больница №3 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) с 2006 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: у 21 – мембранозная нефропатия (МН), у 4 – нефрит с минимальными изменениями (МИ), у 9 – фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС); у 19 – мезангиокапиллярный ГН (МКГН). У 41 больного выявлен мезангиопролиферативный ГН (МППН) и у 11 – нефросклероз в исходе гломерулонефрита.

Результаты исследования молекулярных медиаторов сравнивали в группах больных, различающихся по степени активности ХГН. Клинико-лабораторная характеристика обследованных больных ХГН приведена в таб. 1.

Группу I составили 57 пациентов с выраженным мочевым синдромом (МС): у 41 больного 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 в дальнейшем ХГН протекал с МС. Клинически больные I группы характеризовались ПУ субнефротического уровня без биохимических признаков НС; у 33 из 57 больных ПУ сочеталась с малой или умеренной эритроцитурией.

Артериальная гипертензия (САД от 150 до 190 мм рт. ст., ДАД от 100 до 110 мм рт. ст.) выявлялась у 15 больных. Уровень креатинина и СКФ в среднем по группе были в пределах нормы.

В группу II включен 71 больной с НС различной выраженности: у 24 больных отмечался тяжелый НС с протеинурией от 6,0 до 20,0 г/сут, гипоальбуминемией от 16,8 до 20,5 г/л, периферическими отеками до степени анасарки, наличием полостных отеков.

У 25 больных этой группы НС сопровождался почечной дисфункцией (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), что соответствует хронической болезни почек (ХБП) 3 стадии, у 13 из них с наиболее активным течением ХГН НС сочетался с остонефритическим синдромом (ОНС) (эритроцитурия от 20 до 100 в п.зр., САД от 150 до 200 мм рт. ст., ДАД 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 составил 31 больной с неактивным нефритом: из них 9 – с ремиссией нефротической формы ХГН после успешной иммуносупрессивной терапии. У больных этой группы выявлялась небольшая ПУ, у 16 из них – изолированная, у 15 – в сочетании с минимальной или умеренной эритроцитурией (в среднем 6 [1;20] в п.зр.). Артериальная гипертония (САД от 140 до 170 мм рт. ст., ДАД от 95 мм 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, что соответствует ХБП 2-3 стадии.

Таблица 1

**Клиническая характеристика обследованных больных ХГН
(n=159)**

Группа Показатели	I группа (МС) n=57	II группа (НС в целом) n=71	Умеренный НС n=47	выраженный НС n=24	III группа (неактив- ный ХГН) 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]
АД сист. (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]
АД диаст. (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]

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 почечной функцией.

У 37 пациентов с активным ХГН был проанализирован характер течения заболевания и ответ на стандартную иммуносупрессивную терапию преднизолоном и цитостатиками в течение ближайшего года наблюдения в зависимости от исходной величины изученных молекулярных медиаторов моче и сыворотке крови. 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.

Оценка антипротеинурического действия препарата, блокирующего эффекты МСР-1, у больных с ХГН

Отобраны 7 больных с ХГН (1 с МКГН, 1 – МН, 1 – МИ, 1- ФСГС, 2 – МезПГН; 1 женщина и 6 мужчин в возрасте 31 [24; 57] года) с активным течением ХГН, у которых возможно было отсрочить патогенетическое лечение кортикостероидами и цитостатиками на 3 месяца без высокой вероятности ухудшения.

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.).

У этих больных был применен разработанный в ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ препарат, представляющий собой пептид X молекулы МСР-1(65-76 МСР-1), который блокирует эффекты МСР-1 путем связывания гликозаминогликанов на поверхности клеток и конкурентного вытеснения эндогенного МСР-1 и, возможно, других хемокинов, благодаря чему осуществляется противовоспалительное действие и протективное влияние на подоциты (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.)

Применена следующая схема (рис.1): в первую неделю лечения - 6 инъекций по 2,5мг с интервалами 6 ч между двумя первыми, 24 ч - между последующими двумя, 48 ч - между пятой и шестой инъекциями. Первые 2 инъекции выполнялись внутривенно, остальные 4 – внутримышечно (суммарная доза – 15мг).

У 6-ти больных каждые четыре недели курсы лечения повторяли, всего им проведено 3 полных курса. У одного больного в связи с нарастанием НС после однократного курса

лечения на 21 сутки была начата стандартная иммуносупрессивная терапия глюкокортикостероидами и циклофосфамидом.

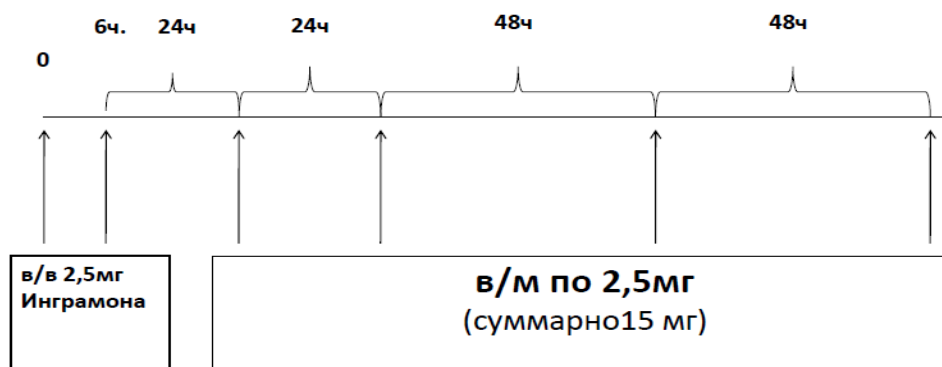


Рисунок 1. Схема введения препарата, блокирующего эффекты МСР-1

Специальные методы исследования

Наряду с общеклиническим обследованием, принятым для нефрологических больных, были применены специальные методы исследования.

В моче больных ХГН, включенных в исследование, **методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА)** были определены:

- Основной белок межподоцитарной щелевой диафрагмы - нефрин,
- Провоспалительные факторы: моноцитарный хемотаксический протеин-1 и интерлейкин-6, Фактор апоптоза подоцитов - каспаза-9

Показатели, отражающие функционирование «системы самозащиты почки»:

Белки теплового шока-27 и 70 (внутриклеточные протективные белки, действие которых направлено на восстановление структуры и функции клеток в процессе повреждения)

Фактор выживаемости подоцитов - сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF)

Противовоспалительные цитокины - интерлейкин -10, антагонист рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1ра).

Компоненты протеолитической системы - Матриксные металлопротеиназы -2 и -9, тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-2

В моче методом цитофлуометрии изучен показатель подоцитурии (наличие подоцитов и их фрагментов в моче, результат отслоения и слущивания подоцитов от гломерулярной базальной мембраны)

В сыворотке крови методом ELISA был исследован уровень:

- *АТ к БТШ-70* (отражающих активацию противовоспалительных механизмов в ответ на экспрессию БТШ70 клетками в очагах повреждения/воспаления).

В ткани почек 40 больных ХГН **иммуногистохимическим пероксидазным методом** была изучена экспрессия:

-*белок Wilms tumor- 1 (WT-1) (маркер ядер подоцитов)*

-белок теплового шока-70;

-FoxP3 (транскрипционный фактор Т-регуляторных клеток, используемый в качестве маркера этих клеток).

- матриксная металлопротеиназа-9

Экспрессия БТШ-70 и матриксной металлопротеиназы-9 *в ткани почки* была оценена полуколичественно (в баллах) иммуногистохимическим пероксидазным методом.

Морфометрическим методом проведен подсчет противовоспалительных Т-клеток, меченых FoxP3, и количества подоцитов по ядерному маркеру антигена опухоли Вильмса-1 (WT-1). С помощью *морфометрического* подсчета (FoxP3+) ядер было определено число противовоспалительных клеток в интерстициальной ткани почки (в корковом слое на участке 1,5 мм²).

Спектр изученных мочевых, сывороточных и тканевых показателей и методы их определения представлены в таб. 2 и 3.

Таблица 2

Молекулярные медиаторы в моче и сыворотке больных ХГН и методы их определения

Изученные показатели	Метод определения, наборы реактивов для исследования	Количество больных ХГН
Нефринурия (моча)	ELISA (Uscnc Life Science Inc. Wuhan, 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 (моча)	ELISA (R&D Systems Quantikine, США)	77
ТИМП-2	ELISA (R&D Systems Quantikine, США)	77

Показатели, изученные в ткани почки больных ХГН

Изученные медиаторы	Метод определения, наборы реактивов для исследования	Количество больных ХГН
Иммуногистохимическое исследование		
БТШ-70	«SpringBioscience» (США)	40
FoxP3	«SpringBioscience» (США)	40
ММП-9	«Daco», Дания	55
Морфометрическое исследование		
Количество WT-1 позитивных ядер в клубочке		40
Количество Т-рег. лимфоцитов (FoxP3-положительные ядра в 1,5 мм ² ткани почки)		40

Методы статистической обработки

Статистический анализ проводили с применением стандартных статистических методик с помощью программы STATISTICA 6,0 и SPSS 23. При описании данных клинико-лабораторного обследования больных ХГН и изученных медиаторов, имеющих отличное от нормального распределение (не Гауссовское распределение), оценивали медиану и интерквартильный размах [25; 75 процентиля]. Для сравнений в 2 группах использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, множественных сравнений - критерий Вилкоксона. Для выявления и оценки связей между исследуемыми показателями, применяли непараметрический метод ранговой корреляции. Достоверность различий частот в двух группах оценивали с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса. Для оценки прогностического значения показателей применен метод Каплан-Майер, достоверность различий оценена по лог-ранговому критерию. Для оценки информативности изученных показателей применяли ROC-анализ и рассчитывали площадь под кривой (AUC).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Показатели подоцитарного повреждения у больных ХГН

Уровень экскреции нефрина с мочой больных ХГН

Нарушение функции подоцитов у больных ХГН было оценено по экскреции с мочой основного белка щелевой диафрагмы нефрина. Уровень нефринурии у больных активными формами ХГН был выше (группа I и группа II), чем у больных с ремиссией заболевания (группа III) и у здоровых лиц, причем у больных с НС (группа II) он оказался значимо выше, чем у больных с умеренной ПУ (группа I). Наиболее высокий уровень отмечен у пациентов с тяжелым НС (таблица 4). При этом у пациентов с НС и почечной дисфункцией показатели нефринурии были достоверно выше, чем у пациентов с сохранной функцией почек.

Различия между морфологическими формами, как первичными «истинными» подоцитопатиями (болезнь минимальных изменений, ФСГС, мембранозная нефропатия), так и пролиферативными формами ХГН (МезПГН, МКГН) по показателю нефринурии были недостоверны, решающую роль играла выраженность нефротического синдрома (рис. 2).

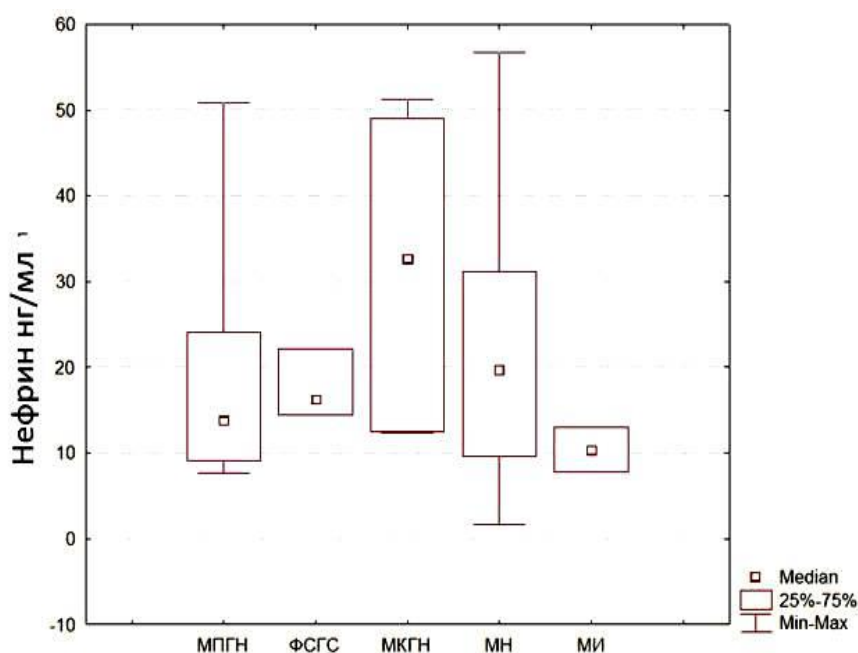


Рисунок 2. Показатель нефринурии у больных с различными морфологическими формами ХГН (n=94)

Уровень подоцитурии у больных ХГН

Наряду с нефринурией у больных активными формами ХГН наблюдалась подоцитурия, как следствие отслойки от гломерулярной базальной мембраны и слущивания поврежденных

подоцитов в моче, что прослежено на основании изучения методом цитофлоуметрии в мочевом осадке меченных антителами к подокаликсину (Pdx) подоцитов. (рис. 3).

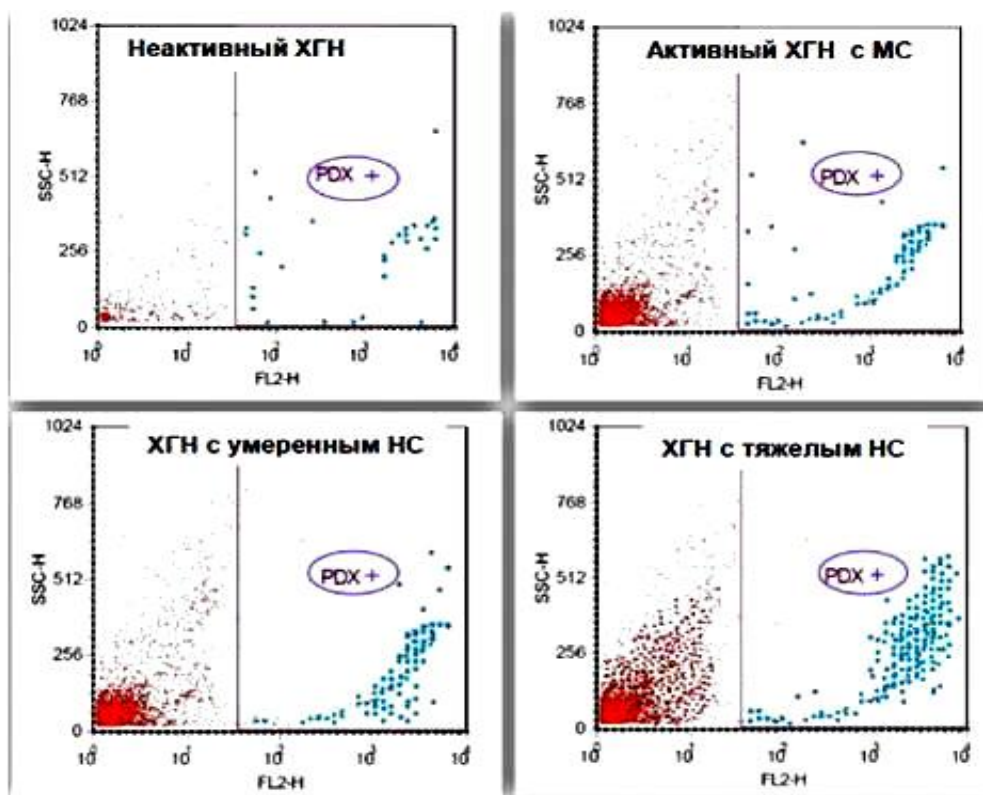


Рисунок 3. Цитофлоуграммы мочи у больных с различной активностью ХГН

У пациентов с (МС) (группа I) величина подоцитурии достоверно превышала этот показатель у пациентов с неактивным течением нефрита (группа I). Наиболее высокий уровень подоцитурии был отмечен у больных с НС (группа II) (таб. 4). Как и величина нефринурии, показатель подоцитурии коррелировал с выраженностью ПУ, гипоальбуминемии, а также длительностью персистирования НС, что свидетельствует о нарастающей со временем тяжести подоцитарного повреждения у больных с НС (таб. 5). В то же время достоверной связи подоцитурии с уровнем креатинина сыворотки крови, эритроцитурии и тяжести артериальной гипертензии отмечено не было. Между показателями подоцитурии и нефринурии отмечена тесная корреляция ($R_s=0,9$, $p<0,05$).

Таблица 4

Показатели нефринурии и подоцитурии у больных ХГН

Группы обследованных больных	n	Подоцитурия, (pdx ⁺ кл/мкл)	Нефринурия, (нг/мл)
Здоровые	10	0[0;0,6]	7,9 [1,7; 9,5]
ХГН I группа (с выраженным МС)	23	5,45 [2,5;18,3]	9,5 [7,6; 13]*
ХГН II группа (НС)	38	12,0 [7,0;35,0] **	16,9 [10,9; 27,8] **
Умеренный НС	28	8,0 [4,2;15,5]	16,6 [10,45;27,3]
Выраженный НС	10	36,5[9,0; 80,3]	17,8[16,1;37,5]
ХГН III группа (неактивный)	20	5,4[1,0;9,43]	7,25 [5,4; 9,8]

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

Таблица 5

Взаимосвязь показателей подоцитарного повреждения - подоцитурии, нефринурии с клинико-лабораторными признаками активности ХГН

Показатель	Подоцитурия	Нефринурия
Протеинурия, г/сут	$R_s = 0,23, p < 0,05$	$R_s = 0,27, p < 0,05$
Альбумин сыворотки крови, г/л	$R_s = -0,38, p < 0,001$	$R_s = -0,27, p < 0,05$
Эритроцитурия (выраженность)	$R_s = 0,13, p = 0,52$	$R_s = -0,26, p < 0,05$
Креатинин сыворотки, мг/дл	$R_s = 0,09, p = 0,56$	$R_s = 0,49, p < 0,001$
АД сист. мм рт. ст	$R_s = 0,22, P = 0,13$	$R_s = -0,3, p < 0,05$
АД диаст. мм рт. ст	$R_s = 0,27, P = 0,1$	$R_s = -0,41, p < 0,05$
Длительность НС, мес	$R_s = 0,42, P < 0,05$	$R_s = 0,4, p < 0,05$

Уровень экскреции с мочой белка теплового шока 27 у больных ХГН

У больных ХГН с высокой ПУ (группы I, II) нами выявлено повышение в моче уровня БТШ-27, как результат ослабления его функции в поддержании актинового цитоскелета и регуляции формы ножек подоцитов – основы развития нефротической ПУ. Уровень экскреции БТШ-27 был наиболее высоким у больных с тяжелым НС (группа II), менее значимым у больных с субнефротической ПУ (группа I), и мало отличимым от нормы у больных с ремиссией ХГН (группа III) (таб. 6).

Таблица 6

Уровень экскреции с мочой БТШ-27 у больных ХГН (n=84)

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]
НС умеренный (n=23)	0,94 [0,71; 1,73]
НС выраженный (n=7)	1,88 *[0,8; 7,195]
III. Неактивный ГН (n=10)	0,72 [0,65; 0,98]

Уровень нефринурии прямо коррелировал с выраженностью ПУ ($R_s=0,297$, $p<0,05$). Выявлены прямые достоверные корреляции между уровнем в моче БТШ-27, подоцитурией, нефринурией у больных с НС (рис.4), что, с одной стороны, свидетельствует о значимости этих показателей как патогенетически связанных маркеров подоцитарной дисфункции и важного звена развития протеинурии, с другой стороны, о взаимодействии на территории подоцита факторов повреждения и «системы самозащиты почки», одним из компонентов которой являются БТШ.

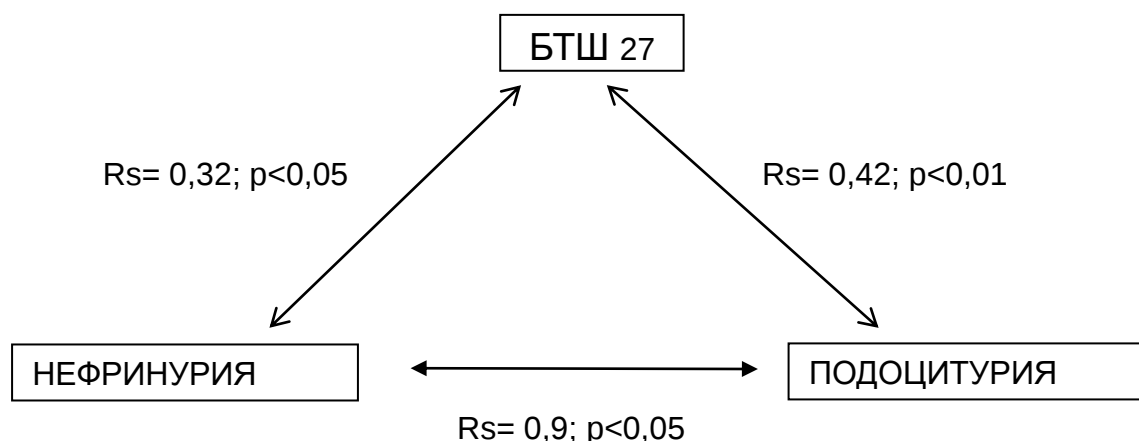


Рисунок 4. Взаимосвязь показателей подоцитарного повреждения у больных ХГН с НС

Факторы апоптоза и выживаемости подоцитов в моче больных ХГН

Важной составляющей механизма потери подоцитов и нарастания ПУ является усиление апоптоза этих клеток, маркерами которого служит активация каскада внутриклеточных каспаз. При изучении уровня экскреции каспазы-9 с мочой больных активными формами ХГН было показано, что у пациентов с НС уровень каспазы-9 в моче значимо выше, чем у больных с МС (рис. 5).

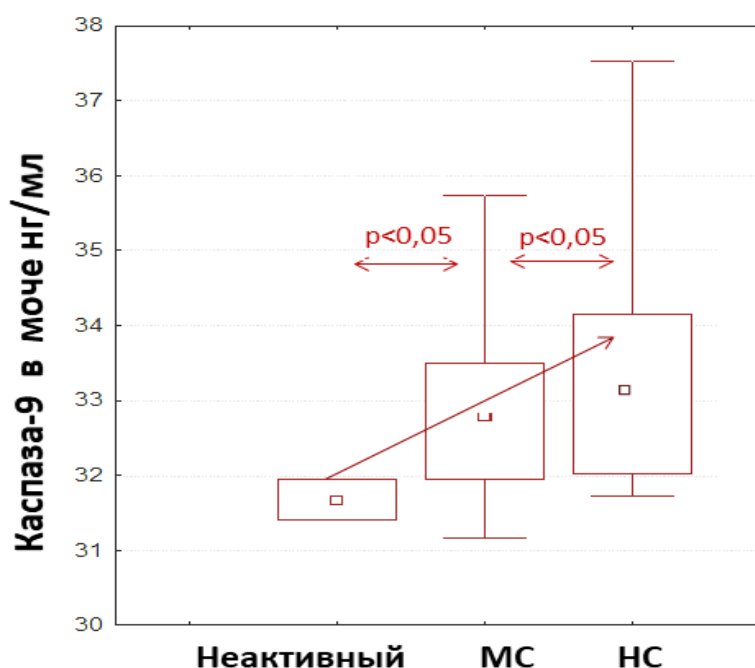


Рисунок 5. Экскреция каспазы-9 с мочой больных ХГН

Уровень каспазы-9 нарастал параллельно повышению уровня нефринурии и ПУ, что указывает на вклад процессов апоптоза в подоцитарное повреждение, приводящее к развитию ПУ у больных ХГН (рис. 6).

Мы получили еще одно свидетельство снижения выживаемости подоцитов, на основании изучения экскреции с мочой антиапоптотического фактора VEGF, который продуцируется подоцитами и по современным представлениям поддерживает функцию нефрина, способствуя сохранению целостности гломерулярного барьера.

Уровень VEGF в моче 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 (рис. 7).

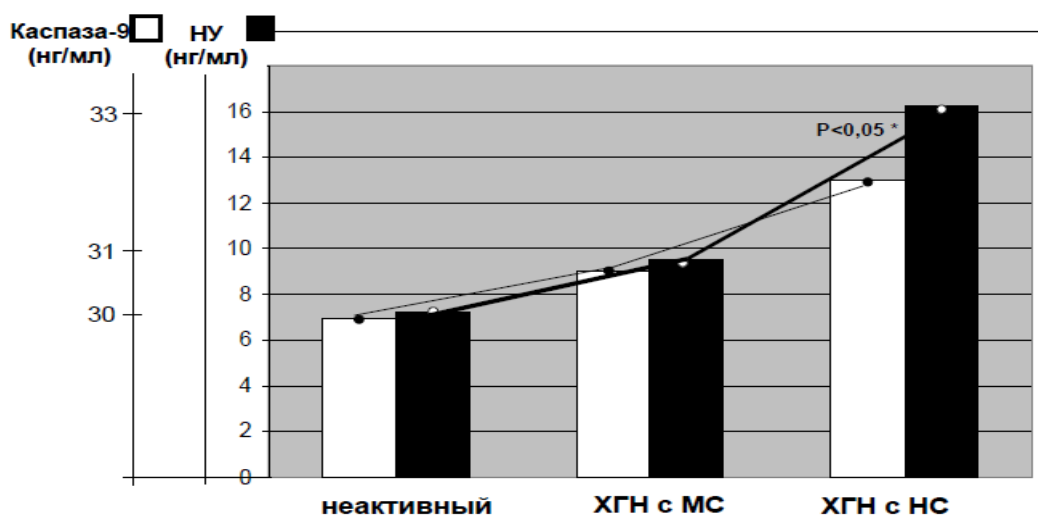


Рисунок 6. Соотношение экскреции с мочой каспазы-9 и нефрина у больных ХГН

Величина мочевого показателя VEGF у больных активным ХГН (группа I,II) с сохранной функцией почек прямо коррелировала с уровнем ПУ ($R_s=0,673$ $p<0,0001$), в то же время у пациентов с прогрессирующим течением и нарушением функции почек степень снижения VEGF прямо коррелировала 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.6), при этом была получена обратная корреляция между величиной экскреции с мочой VEGF и выраженностью нефринурии ($R_s=-0,8$, $p<0,05$).

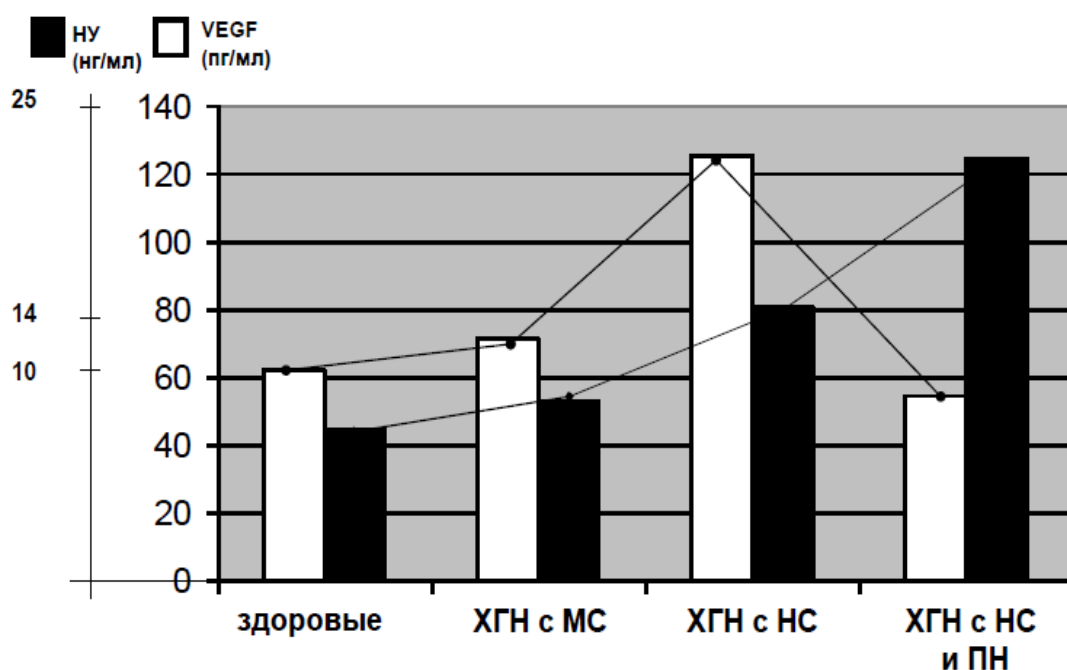


Рисунок 7. Соотношение экскреции с мочой VEGF и нефрина у больных ХГН

**Иммуногистохимическая оценка в биоптатах почки больных ХГН
матриксной металлопротеиназы-9 и подоцитопении**

По современным представлениям экспрессия в клубочках почек ММП-9 отражает процесс эпителиально-мезенхимальной трансдифференциации подоцитов, способствующей их отслойке с базальной мембраны клубочка со слушиванием в мочу. В нашем исследовании наиболее высокая экспрессия ММП-9 в клубочках почек выявлялась у пациентов с НС, в то же время уровень экспрессии ММП-9 в склерозированных клубочках был резко снижен (рис. 8).

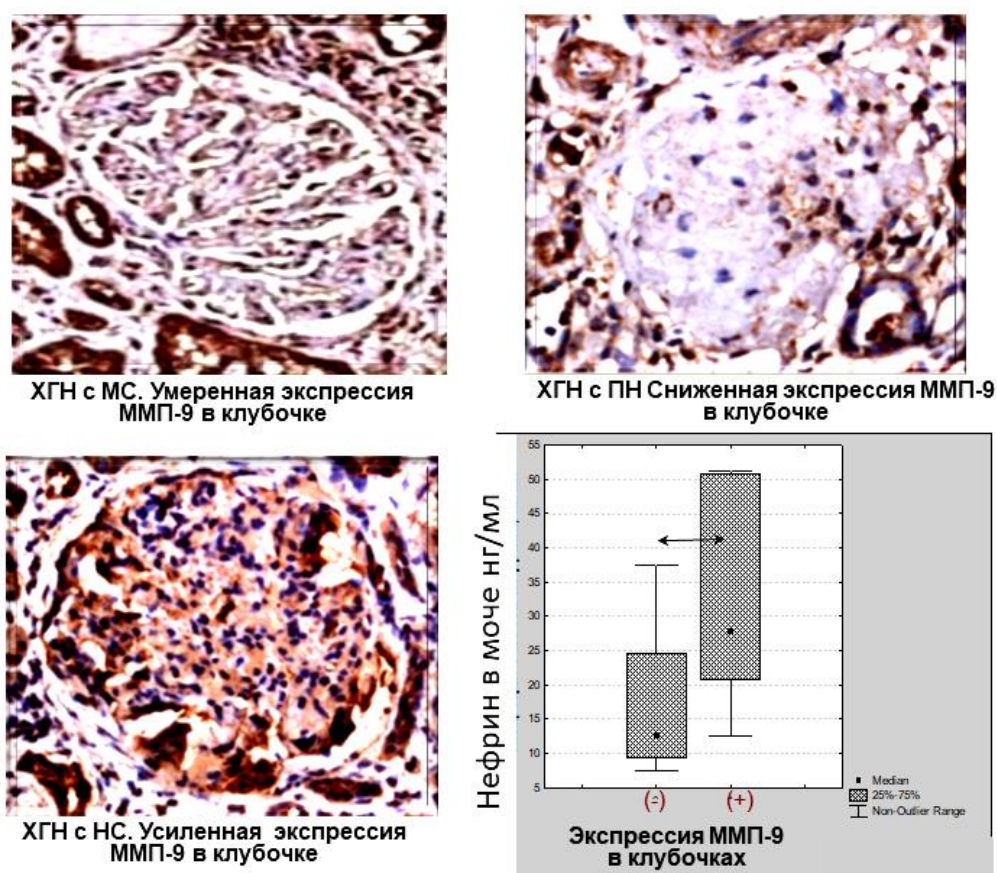


Рисунок 8. Экспрессия ММП-9 в клубочках почек больных ХГН

У больных с активными формами ХГН увеличение экспрессии ММП-9 в почечных клубочках сочеталось с высокими показателями нефринурии (рис 8), указывая на важную роль механизмов эпителиальной трансдифференциации в развитии подоцитопении в ткани почки.

Прогрессирующая потеря подоцитов в клубочках почек была подтверждена нами иммуногистохимическим методом с оценкой числа подоцитов, меченых по ядерному маркеру антигену опухоли Вильмса (WT-1) (рис.9).

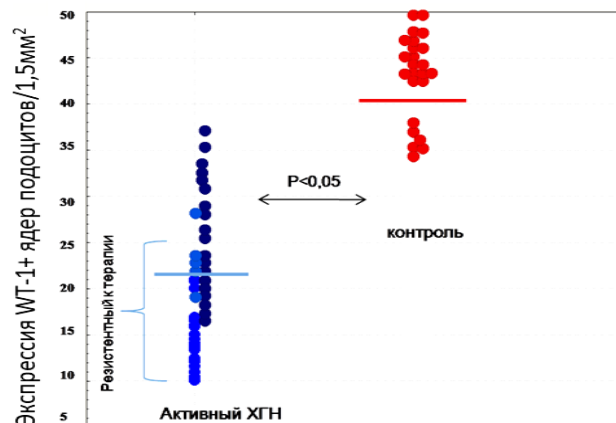


Рисунок 9. Оценка выраженности подоцитопении по экспрессии WT-1 у больных ХГН

Установлено, что количество экспрессирующих WT-1 ядер подоцитов у больных активным ХГН с НС было снижено (21 [16, 27,5] кл/срез клубочков) по сравнению с контролем (44 [38; 47] кл/срез клубочка $p < 0,05$) (рис. 9), что отражает уменьшение общего пула подоцитов в клубочках, наиболее выраженное у больных с тяжелым НС и почечной дисфункцией (рис. 10).

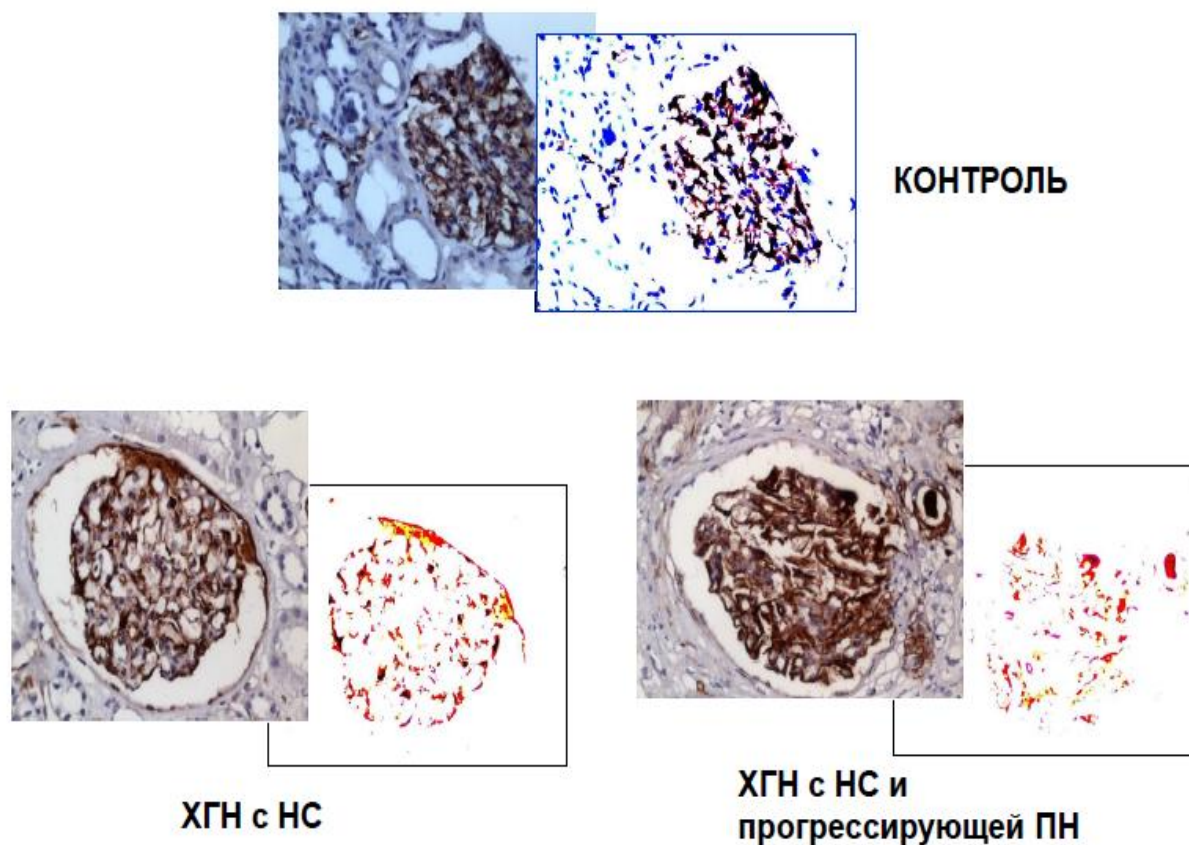


Рисунок 10. Исследование экспрессии WT-1 (степени подоцитопении)

в клубочках почек больных ХГН

Выявлена обратная достоверная корреляция между выраженностью подоцитопении и величиной подоцитурии ($R_s = -0,35$, $p < 0,05$), которую в настоящее время рассматривают как детерминанту гломерулосклероза (рис. 11).

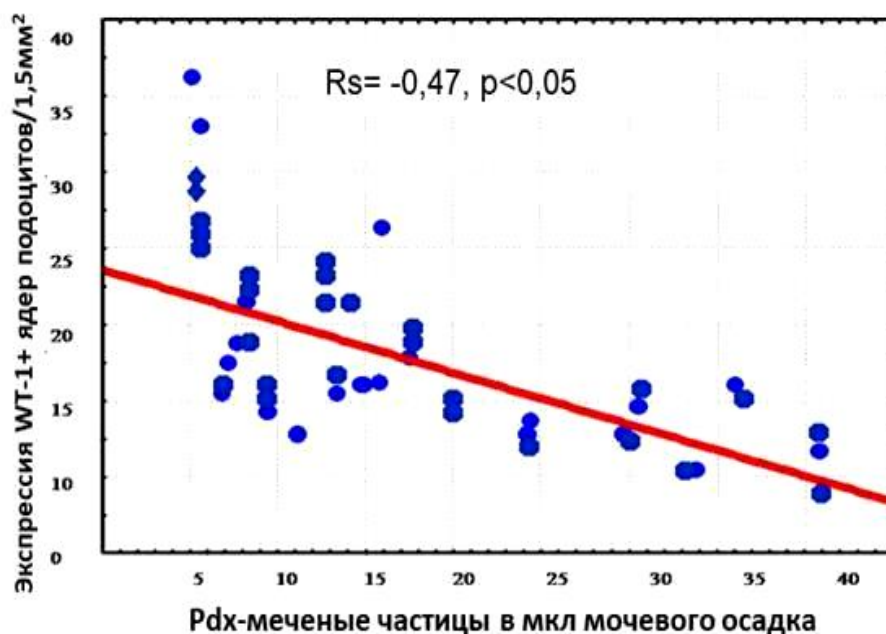


Рисунок 11. Корреляция между подоцитурией и показателем экспрессии WT-1 в ткани почки

Мы разработали математическое уравнение, позволяющее рассчитывать степень подоцитопении на основании показателя подоцитурии, что может иметь практическое значение для неинвазивного мониторинга процессов повреждения клубочков.

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

где $\exp$ – экспонента; ПОД – показатель подоцитурии, выраженный в количестве экспрессирующих подокаликсин клеток в 1 мкл осадка мочи (метод цитофлуометрии).

Согласно проведенному нами ROC-анализу подоцитурия более 20 кл/мкл осадка мочи является предиктором выраженной (более 50% от общего количества подоцитов в клубочке) подоцитопении и, соответственно, риска гломерулосклероза, и может использоваться в клинике для оценки прогноза ХГН (рис. 12).

У больных с НС, не ответивших в течение 6 месяцев на проводимую стандартную иммуносупрессивную терапию, степень подоцитопении была более выражена (16 [14;20] кл/срез кл) и соответствовала более 50% потери подоцитов, чем у больных, достигших

ремиссии нефрита (30 [23;33] кл/срез кл) – около 31% потери общего числа подоцитов ($p < 0,05$).

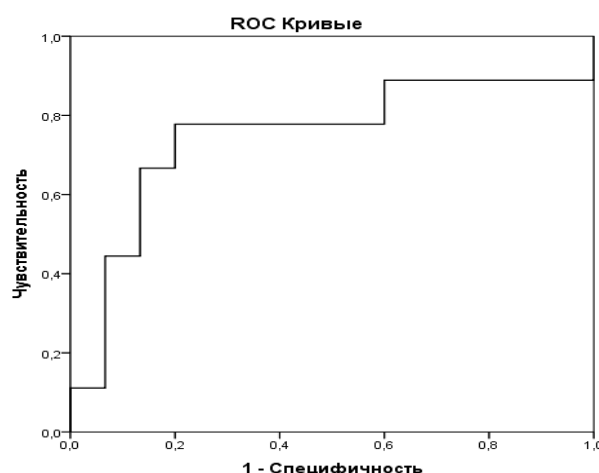


Рисунок 12. Информативность подоцитурии как маркера подоцитопении (площадь под кривой 0,748)

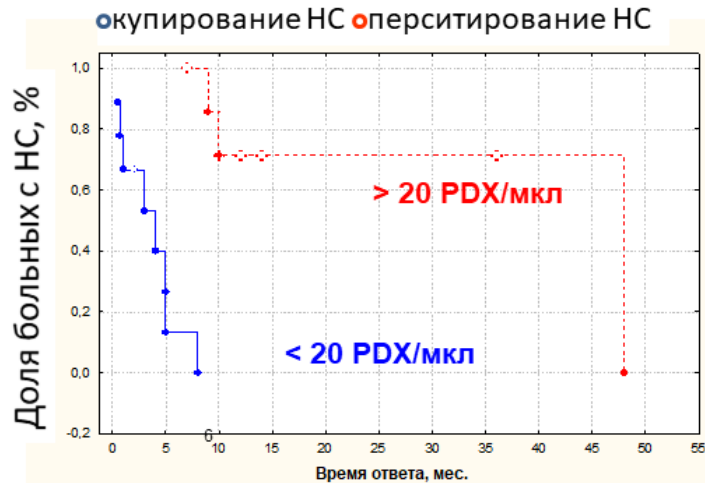
Выявлена обратная достоверная корреляция выраженности экспрессии WT-1 в клубочках, отражающая степень подоцитопении, с величиной протеинурии ($R_s = -0,35$, $p < 0,05$) и подоцитурии ($R_s = -0,47$, $p < 0,05$)

Можно сделать вывод о том, что для восстановления подоцитарного слоя гломерулярного фильтра и снижения протеинурии необходимо более активное и длительное лечение.

Прогностическое значение исследованных показателей у больных ХГН

Влияние подоцитарной дисфункции на характер течения ХГН наглядно прослеживалось при анализе эффекта иммуносупрессивной терапии: у больных с высоким исходным уровнем нефринурии (более 17 нг/мл) и подоцитурии (более 20 кл/мкл) и низким уровнем VEGF (менее 124 нг/мл) ответ на терапию был значительно хуже. У большей части этих больных НС характеризовался резистентностью к иммуносупрессивной терапии, несмотря на применение различных схем лечения, рекомендованных для конкретных клинико-морфологических вариантов ХГН. Относительный риск резистентности к проводимой терапии у больных с высоким показателем подоцитурии был в 5 раз выше, чем у больных с низкими значениями. Таким образом, исходный уровень этих показателей позволяет прогнозировать ответ на лечение у больных ХГН (рис. 13).

ПОДОЦИТУРИЯ



НЕФРИНУРИЯ



ЭКСКРЕЦИЯ VEGF

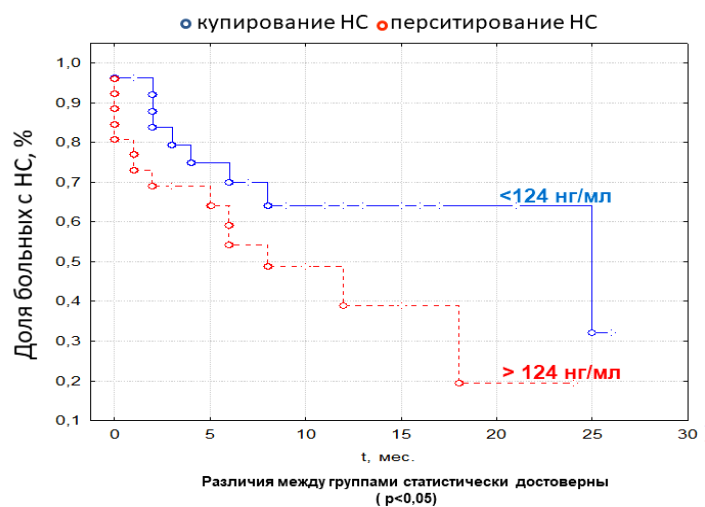


Рисунок 13. Ответ на иммуносупрессивную терапию у больных ХГН с НС в зависимости от исходного уровня подоцитарных маркеров (n=55)

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 $AUC=0,818$, 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. 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.14). Относительный риск резистентности к проводимой терапии для показателя подоцитурии был в 5 раз выше.

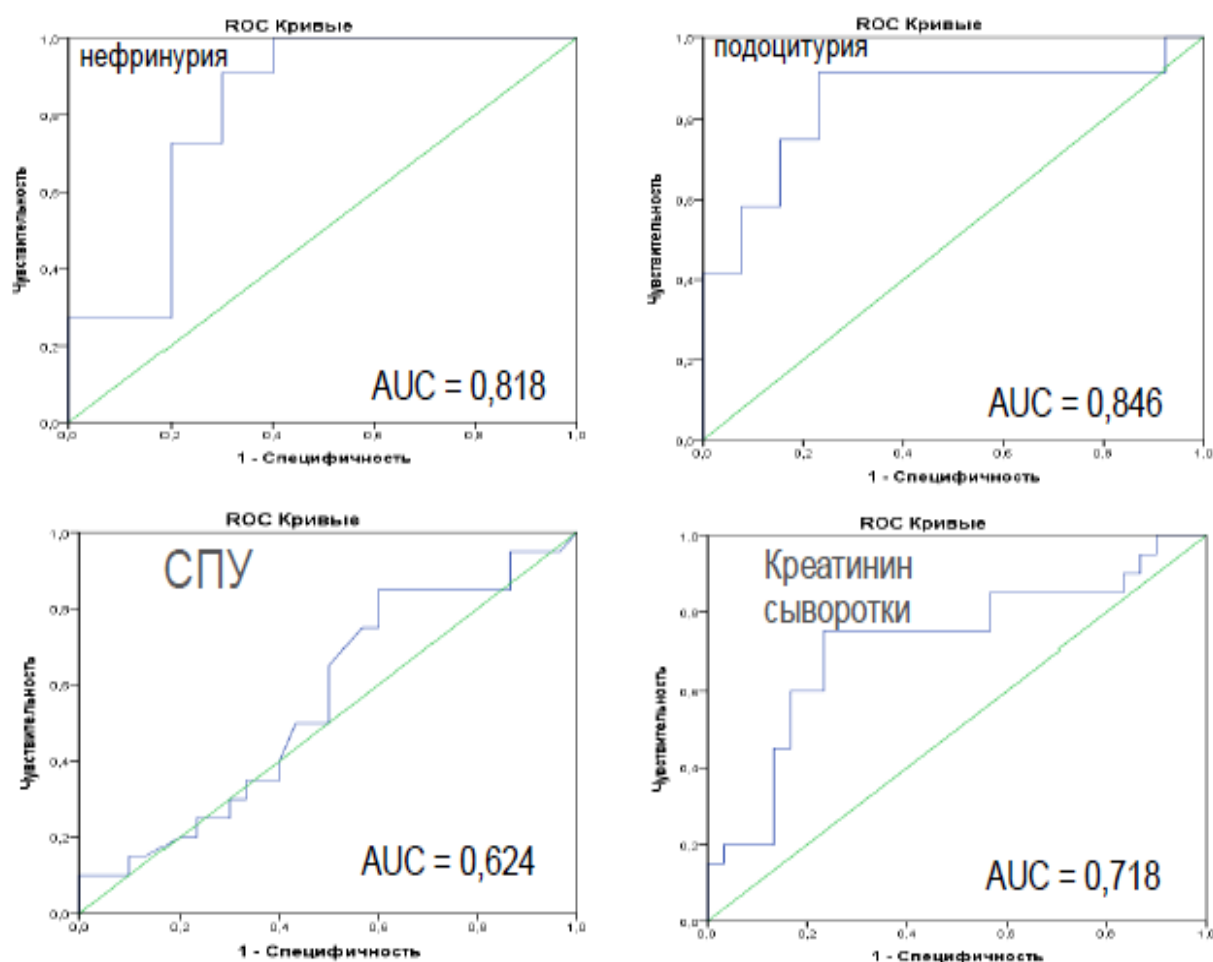


Рисунок 14. Диагностическое значение подоцитарных показателей, протеинурии и креатинина сыворотки крови для прогнозирования эффективности иммуносупрессивной терапии у больных ХГН

Исследование факторов «системы самозащиты почки» у больных ХГН

Исследование БТШ70 в ткани почки, моче и сыворотке крови больных ХГН

Нарушения функции подоцитов при ХГН сочетаются с процессами ремоделирования тубуло-интерстиция: повреждением тубулярного эпителия, тубуло-интерстициальным воспалением и фиброзом, в первую очередь, из-за несостоятельности системы самозащиты почки в условиях нефротоксического действия ПУ. Нами изучена экспрессия в различных структурах почки одного из компонентов этой системы – БТШ-70. У больных активными формами ХГН БТШ-70 экспрессировался в подоцитах, париетальных эпителиальных клетках капсулы, в тубулоинтерстиции - эпителиальных клетках канальцев, строме, клетках воспалительного инфильтрата, фибробластах. Экспрессия была более интенсивной у больных с тяжелым НС, особенно с почечной дисфункцией (рис. 15).

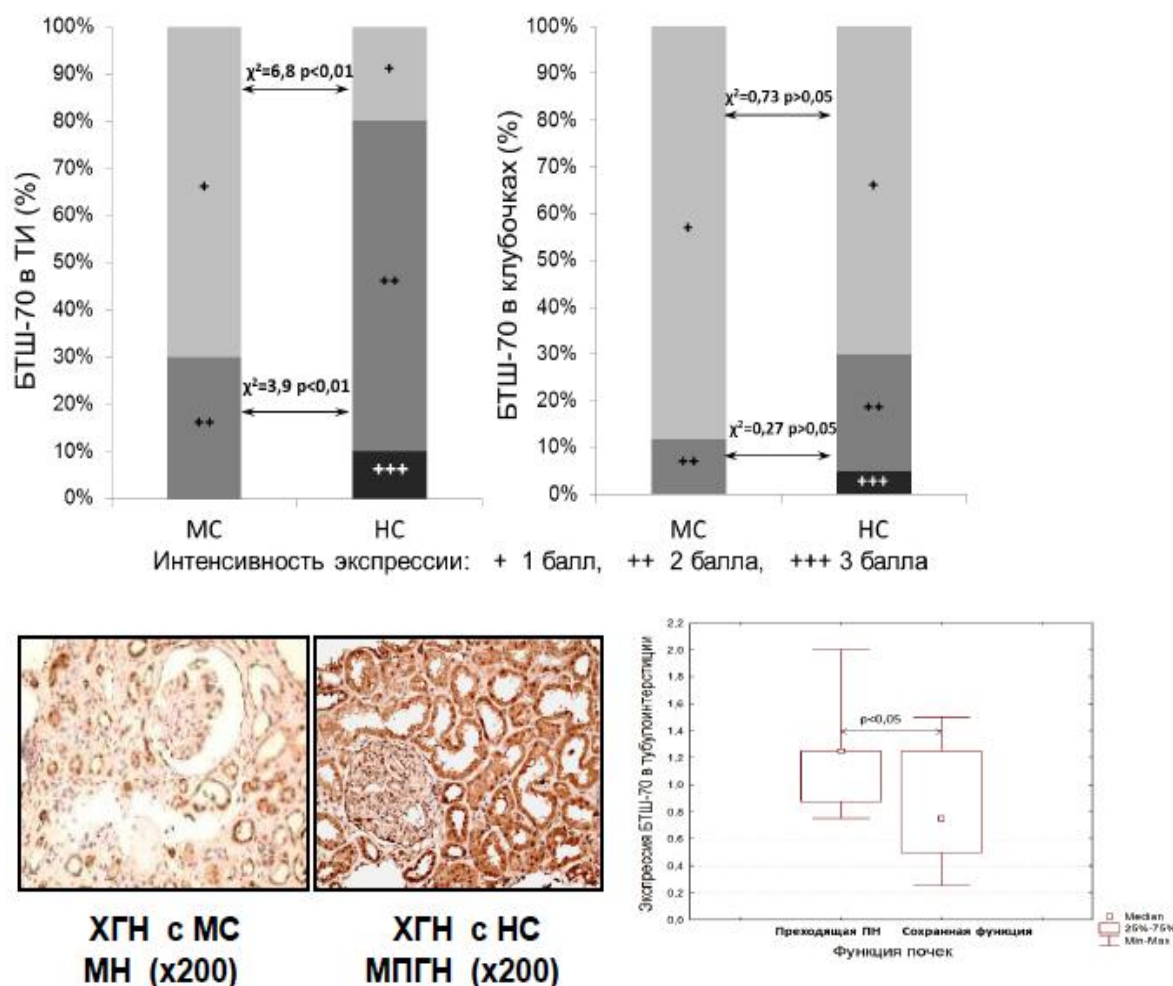


Рисунок 15. Частота выявления экспрессии БТШ-70 в тубуло-интерстиции и клубочках почек больных ХГН

У больных с высокой ПУ, имеющих наиболее выраженные признаки повреждения клеток тубулоинтерстиция, уровень БТШ-70 в моче также значительно нарастал, что обосновывает

значение этого мочевого теста для оценки величины БТШ-70, высвобождаемого из поврежденного тубуло-интерстиция в мочу.

Нами исследована также иммунорегуляторная функция БТШ-70 на основании определения в сыворотке крови уровня антител к эпитопам этого белка, стимулирующих образование клона противовоспалительных Т-регуляторных клеток (Трег). Выявлено снижение уровня сывороточных антител к БТШ-70 у больных с НС, особенно при присоединении почечной дисфункции (рис. 16).

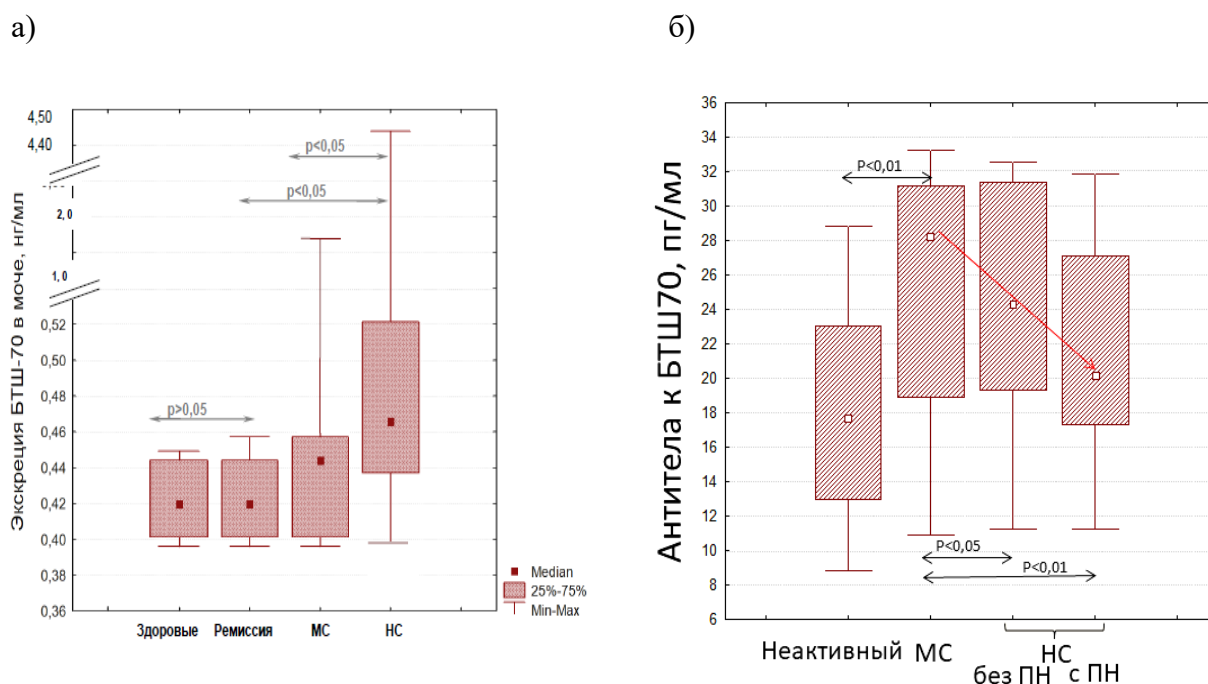


Рисунок 16. Экскреция БТШ-70 с мочой (а) и уровень антител к БТШ-70 в сыворотке крови (б) больных ХГН

Уровень анти- БТШ-70-антител в сыворотке крови имел прогностическое значение при ХГН. У больных с низким уровнем антител к БТШ-70 НС характеризовался торпидностью течения. Так, у 12 из 21 (57,1%) пациента с низким уровнем антител к БТШ-70 в сыворотке крови наблюдалась резистентность к проводимой иммуносупрессивной терапии, несмотря на ее длительность в течение 15-20 месяцев. Напротив, у 13 из 16 больных с высоким уровнем антител к БТШ-70 в сыворотке крови (более 22 пг/мл) НС был купирован в течение 6 мес. стандартной иммуносупрессивной терапии (рис. 17). Таким образом, снижение сывороточного уровня антител к БТШ-70 у больных ХГН является фактором неблагоприятного прогноза.

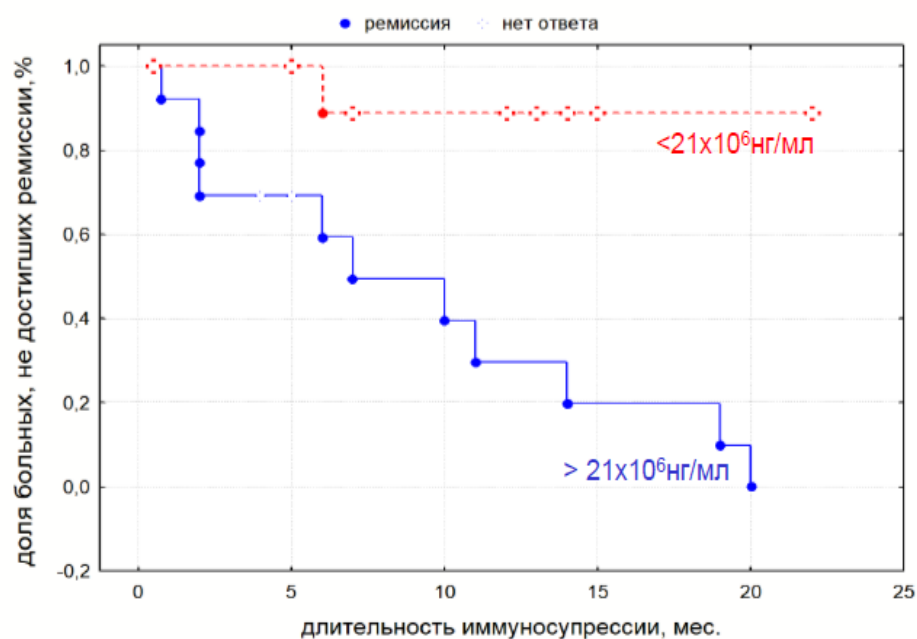


Рисунок 17. Частота достижения ремиссии среди больных ХГН с разным исходным уровнем антител к БТШ-70 в сыворотке крови (n=37)

Оценка дисбаланса механизмов «самозащиты почки» факторов воспаления/повреждения при ХГН

Свидетельством дисбаланса механизмов «самозащиты почки» и повреждения, ведущих к активации воспаления и эпителиально-мезенхимальной трансформации, было выявленное нами у больных с НС и почечной дисфункцией нарушение соотношения экскретируемых с мочой провоспалительной ММП-2 и ингибитора ТИМП-2.

В отличие от здоровых лиц и пациентов с мочевым синдромом (гр. I) у больных высокоактивными формами ХГН с НС (гр. II), выявлялось значимое увеличение уровня в моче ММП-2 (рис. 18), прямо коррелирующего с величиной суточной ПУ ($R_s=0,37$ $p=0,0009$), и обратно - с альбумином сыворотки крови ($R_s=-0,51$ $p=0,01$). Изменения экскреции с мочой ТИМП-2 характеризовались значительным увеличением у больных с НС (гр. II) и прогрессирующим снижением при формировании почечной недостаточности (рис. 18). Полученные результаты об изменении соотношения ММП-2 и ТИМП у больных НС (группа II) с нарушением функции почек свидетельствуют о неконтролируемой (связанной со снижением количества ингибитора) активации ММП-2 и об усилении процесса эпителиально-мезенхимальной трансформации подоцитов и тубулярных клеток с нарастанием гломерулосклероза и интерстициального фиброза.

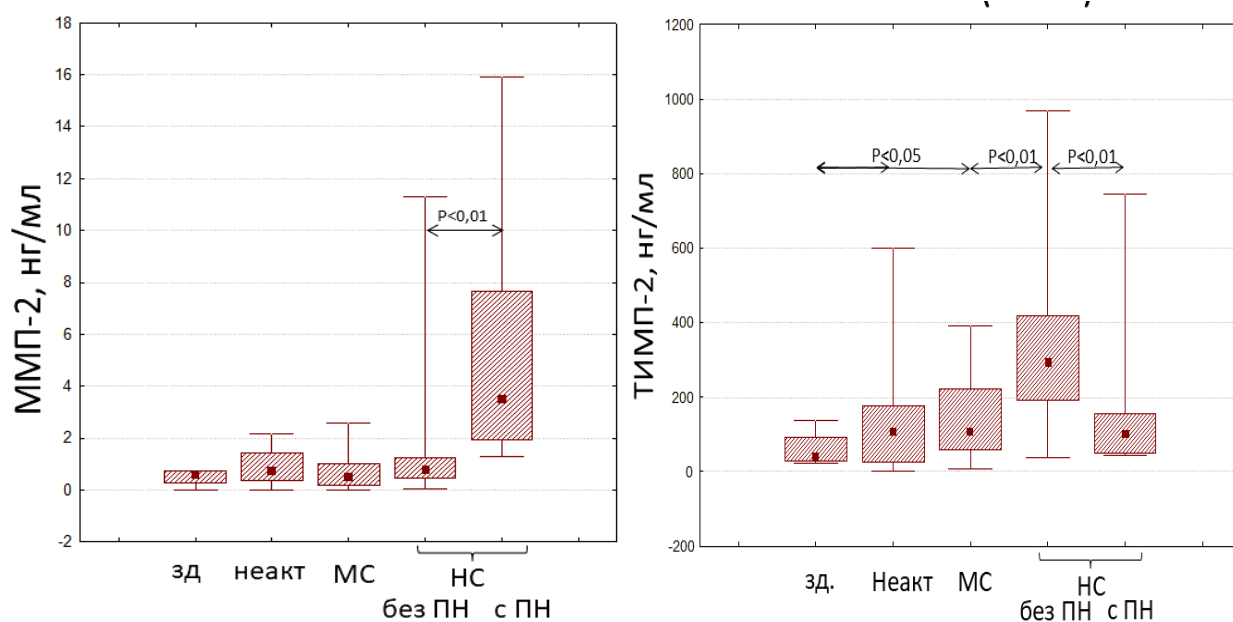


Рисунок 18. Уровень экскреции с мочой матричной металлопротеиназы-2 (ММП-2) и ее ингибитора (ТИМП) у больных ХГН

Об этом же свидетельствует и увеличение экскреции у больных с НС провоспалительного ИЛ-6 и МСР-1, участвующих в развитии тубулоинтерстициального воспаления и фиброза, а также в нарушении функции подоцитов с развитием гломерулосклероза (рис.19).

У больных ХГН с НС (группа II) уровни ИЛ-6 и МСР-1 в моче были выше, чем у больных с МС (группа I) (рис.19), прямо коррелируя с величиной ПУ (соответственно $R_s=0,51$ и $0,55$, $p < 0,001$ и $R_s=0,378$, $p=0,01$) и обратно с белковыми показателями сыворотки крови: альбумином (соответственно $R_s = -0,45$, $p < 0,001$ и $R_s= -0,389$, $p < 0,05$) и общим белком (соответственно $R_s = -0,43$, $p < 0,001$ и $R_s= -0,389$, $p < 0,05$).

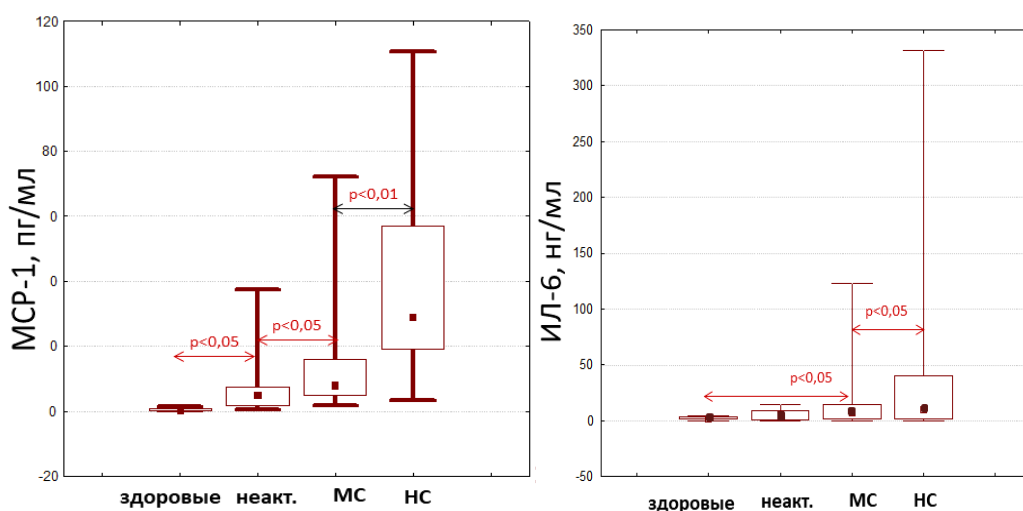


Рисунок 19. Уровень экскреции с мочой моноцитарного хемотаксического протеина-1 и интерлейкина-6 у больных ХГН

Кроме того, у больных с НС 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).

Нами также были изучены экскреция с мочой цитокина ИЛ1- α - основного антагониста, противодействующего ИЛ1- β , и уровень противовоспалительного цитокина - ИЛ-10.

Уровень ИЛ-1 α в моче больных с НС (группа II) был выше, чем у больных с МС (группа I), неактивным течением ХГН (группа III) и у здоровых лиц (рис. 20), что отражает активацию этого противодействующего воспалению звена «системы самозащиты почки» у больных с НС.

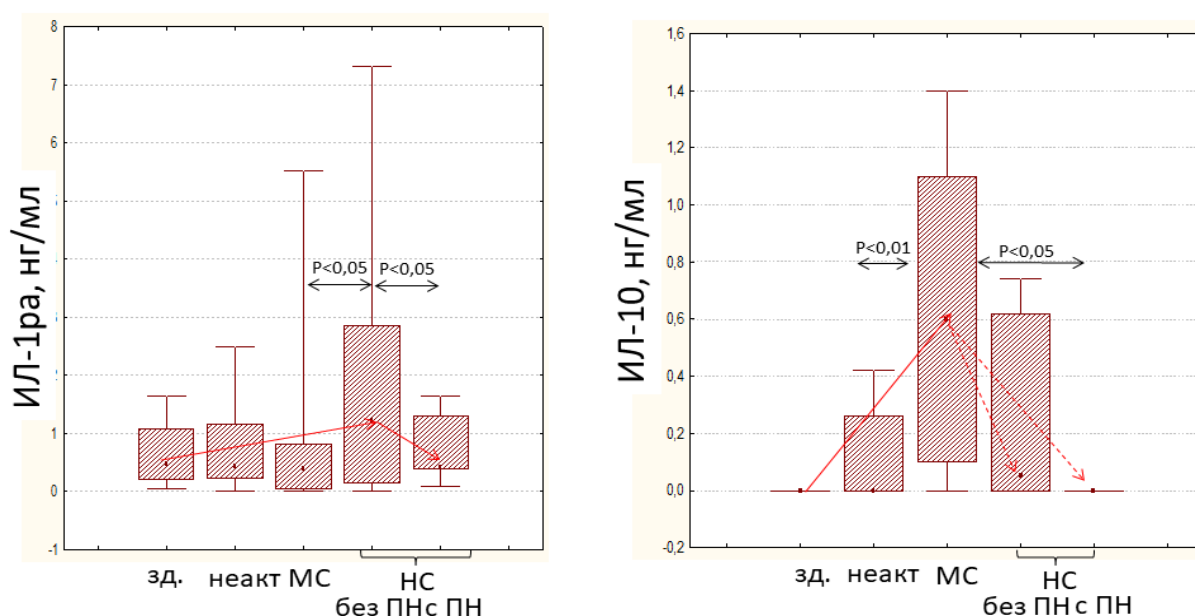


Рисунок 20. Уровень экскреции с мочой ИЛ-1 α и ИЛ-10 у больных ХГН

Однако при присоединении почечной дисфункции отмечено достоверное снижение ИЛ-1 α в моче (рис.20), что, по-видимому, является свидетельством нарастающего дисбаланса в функционировании системы в целом.

ИЛ-10 в моче у большинства здоровых лиц и у пациентов с неактивным ХГН (группа III) выявлялся в малых количествах. При активных формах ХГН (группа I) этот показатель был достоверно выше. У больных с НС и нарушением функции почек показатель ИЛ-10 в моче резко снижался, как результат неспособности к адекватному ответу противовоспалительных механизмов в условиях наиболее активного прогрессирующего течения ХГН (рис. 20).

**Уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в моче
и Т-регуляторных клеток в биоптатах почечной ткани больных ХГН**

Главным источником противовоспалительного ИЛ-10 являются Т-регуляторные (Т-рег) клетки, которые участвуют в механизме иммунологической толерантности к собственным антигенам и обеспечивают контроль иммунного ответа, в том числе при ХГН. Основным регулятором дифференцировки этого фенотипа клеток является транскрипционный фактор forkhead box P3 (FoxP3). По нашим данным, у больных с НС количество Т-рег клеток, меченых FoxP3, в интерстициальной ткани почки было снижено (рис. 21), отмечена обратная корреляция их уровня с величиной суточной ПУ ($R_s = -0,407$ $p = 0,006$). Именно в группе больных с НС и низким уровнем Foxp3 в интерстициальной ткани почки величина экскреции ИЛ-10 с мочой и уровень антител к БТШ-70 в сыворотке крови были резко снижены (рис. 22), что «замыкает» круг нарушений взаимодействия про- и противовоспалительных механизмов в почке при ХГН.

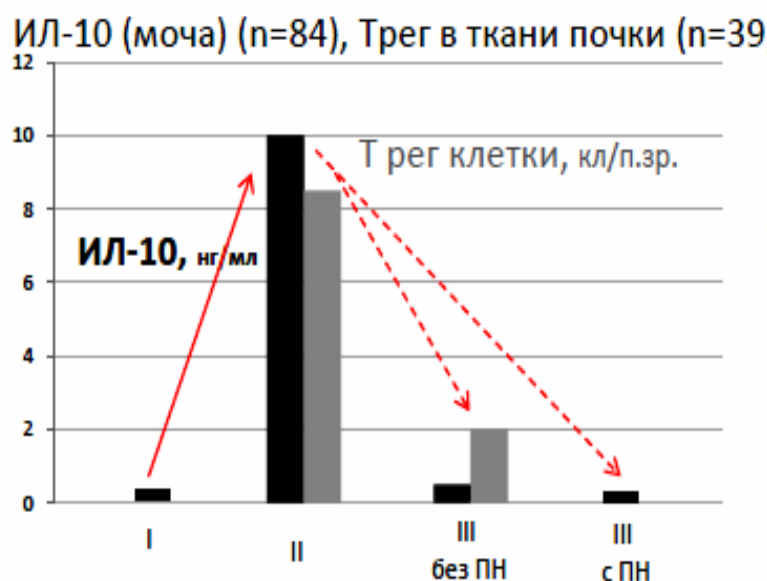


Рисунок 21. Соотношение экскреции ИЛ-10 с мочой и количества клеток Трег в интерстициальной ткани почек у больных ХГН

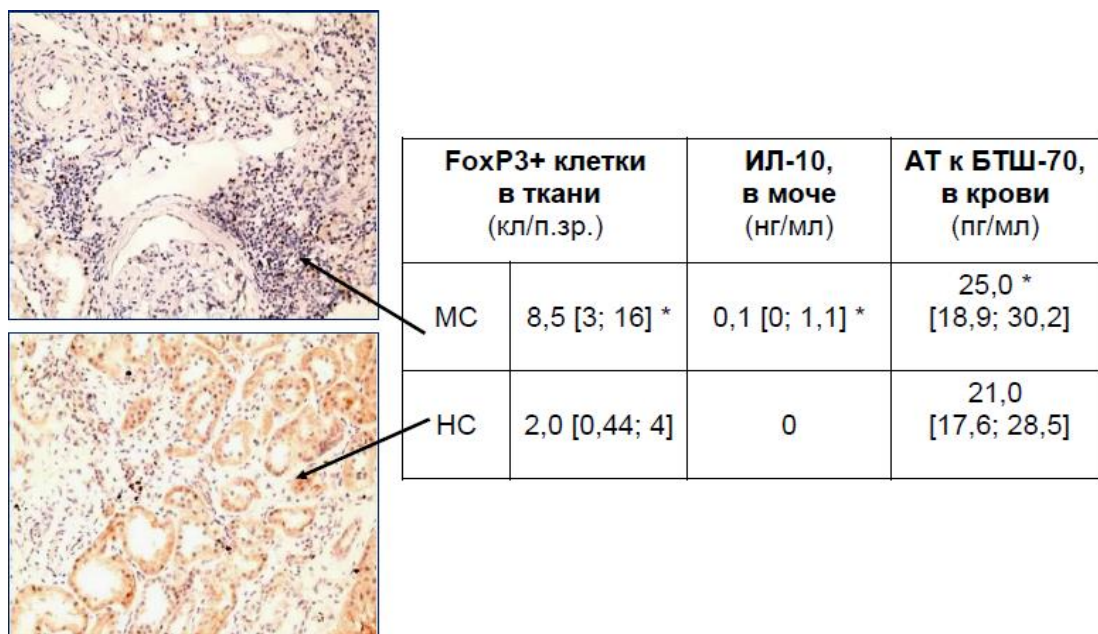


Рисунок 22. Соотношение Трег в интерстиции почек, экскреции ИЛ-10 с мочой и уровня антител к БТШ-70 в сыворотке крови больных ХГН

Результаты применения препарата, блокирующего эффекты моноцитарного хемотаксического протеина -1 (Пептид X МСР-1 65-76)

Суммарная оценка полученных результатов послужила основанием для 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 реальной клинической практике для лечения больных активными протеинурическими формами ХГН отечественного препарата, являющегося конкурентным ингибитором МСР-1 (пептида X 65-76) - одного из важных медиаторов подоцитарного повреждения и ремоделирования тубуло-интерстиция при ХГН.

Лечение проведено у 7 больных клинически активными формами ХГН (с субнефротической ПУ и НС) (рис.1). На 7 сутки после курса введения МСР-1 пептида (65-76) у 6 из 7 больных отмечено достоверное уменьшение ПУ от исходного уровня 3,29 [1,97;5,75] г/сут до 1,28 [0,32;1,64] г/сут, что составило 61 %, $p < 0,05$. 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. (рис. 23).

У одного пациента с НС 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.

После проведения повторных курсов введений пептида МСР-1 (второго и третьего) у 6 пациентов с активным течением ХГН отмечена отчетливая положительная динамика показателей протеинурии (рис.24).

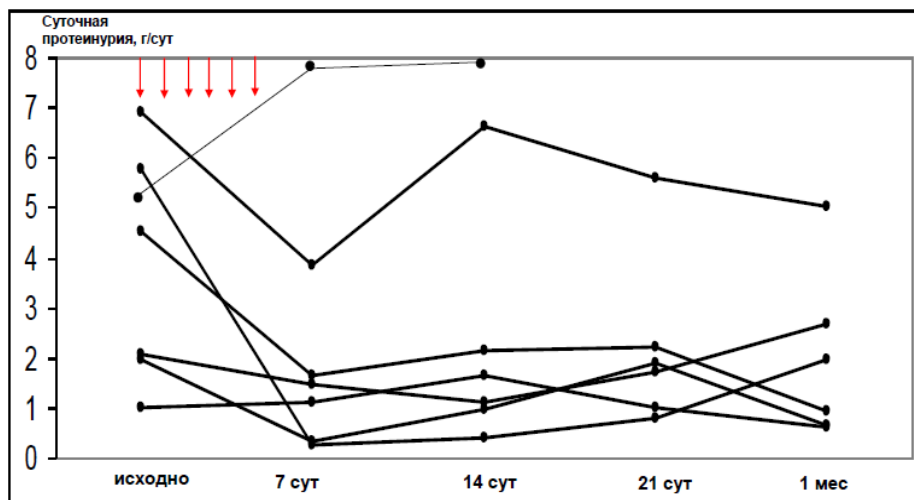


Рисунок 23. Динамика показателя суточной протеинурии у больных активным ХГН после введения МСР-1 пептида (65-75 МСР-1)

Таким образом, у большинства включенных в исследование больных ХГН с выраженной ПУ и НС в результате блокады эндогенного МСР-1 антипротеинурический эффект развился в течение первых 7 суток и сохранялся в течение 3 недель после введения. Отмеченное нами быстрое достижение антипротеинурического эффекта, по-видимому, связано с непосредственным влиянием анти-МСР-1 на подоциты – ключевое звено развития ПУ при ХГН.

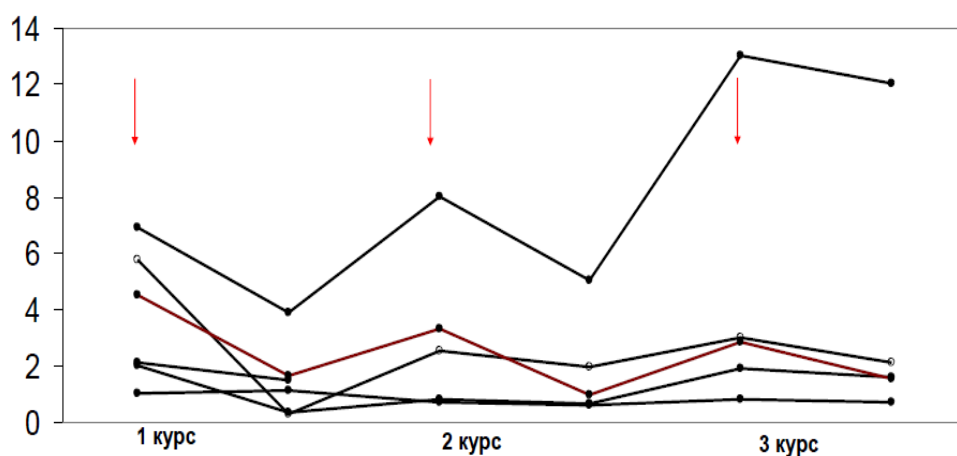


Рисунок 24. Динамика показателя суточной протеинурии у больных активным ХГН в результате 3 последовательных курсов введения МСР-1 пептида (65-75 МСР-1)

Эти результаты подтверждают экспериментальные данные о роли МСР-1 в механизмах подоцитарной дисфункции и обосновывают дальнейшие исследования по применению препаратов, ингибирующих эффекты МСР-1 у больных ХГН.

ВЫВОДЫ

1. У больных ХГН, клинически протекающим преимущественно с ПУ и НС, независимо от морфологического варианта нефрита, выявляется повреждение подоцитов, сопровождающееся экскрецией с мочой структурного белка щелевой диафрагмы - нефрина и белка цитоскелета подоцита - БТШ -27, слущиванием в мочу подоцитов; выраженность этих изменений зависит от особенностей клинического течения ХГН, в первую очередь, от уровня ПУ, выраженности НС, наличия дисфункции почек
2. Увеличение ПУ 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 Сг $R_s = 0,36$, $p < 0,05$, для СКФ $R_s = -0,4$, $p < 0,05$). По данным ROC-анализа информативным показателем ($AUC = 0,784$) выраженной подоцитопении (более 50% от общего числа), указывающей на 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-1ра, 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 тубулоинтерстиция, одним из ключевых звеньев которого является нарушение функции системы белков теплового шока, прежде всего БТШ-70: у больных с высокой ПУ и НС отмечается повышение экспрессии в тубулоинтерстициальной ткани почки БТШ-70 и пропорциональное величине ПУ увеличение его экскреции с мочой.
6. Нарушение в системе БТШ-70 выражается также в изменении их иммунорегуляторной функции – в снижении уровня антител к БТШ-70 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 БТШ-70 (AUC =0,716).
8. Начальный положительный опыт получения антипротеинурического эффекта при применении ингибитора MCP-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 - MCP-1, оказывающих повреждающее действие на подоциты при ХГН.

Практические рекомендации

1. Наряду с общепризнанными маркерами - ПУ и креатинином/СКФ, которые используются для оценки активности и прогноза ХГН, высокой информативностью обладают высокий уровень экскреции с мочой подоцитов (более 20 клеток/мкл мочи) и нефрина (>17нг/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 выраженность 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. Обнаружение у больных ХГН высокой нефринурии и подоцитурии в 5 раз повышает риск торпидного

течения НС и может служить показанием для увеличения объема и длительности иммуносупрессивной терапии.

3. Выявление низкого уровня антител к БТШ-70 в сыворотке крови (менее 21 нг/мл) при повышенном уровне экскреции БТШ-27 и БТШ-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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Чеботарева Н.В.,** Бобкова И.Н., Козловская Л.В. Молекулярные механизмы интерстициального фиброза при прогрессирующих заболеваниях почек// Нефрология и диализ. – 2006г.- № 1. - Т. 8 - С. 26-35.
2. Бобкова И.Н., **Чеботарева Н.В.,** Козловская Л.В., Варшавский В.А., Голицына Е.П. Определение экскреции с мочой моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) и трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF-B1) – неинвазивный метод оценки тубуло-интерстициального фиброза при хроническом гломерулонефрите// **Нефрология.** -2006г. Т. - № 4. -10. – С. 49-55.
3. Бобкова И.Н., **Чеботарева Н.В.,** Козловская Л.В., Варшавский В.А., Голицына Е.П. Экскреция с мочой моноцитарного хемотаксического протеина-1 и трансформирующего фактора роста бета-1, как показатель прогрессирования хронического гломерулонефрита// **Терапевтический архив.** – 2006г.- № 5. - Т. 78. - С. 9-14.
4. Бобкова И.Н., Козловская Л.В., **Чеботарева Н.В.** Мочевые тесты воспаления и фиброза в оценке прогрессирования хронического гломерулонефрита // Качество жизни. – 2006.- № 4 – С. 19-24.
5. **Чеботарева Н.В.,** Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Варшавский В.А. Клиническое значение определения профиброгенных цитокинов в моче и ткани почки больных хроническим гломерулонефритом// Нефрология. – 2009. – Т.13. - №3. - С.70-71
6. **Чеботарева Н.В.,** Н Бобкова И., Козловская Л.В., Варшавский В.А., Голицына Е.П. Определение экскреции с мочой моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) и трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF-B1) у больных ХГН как метод оценки процессов фиброгенеза в почке// **Клиническая нефрология.** -2010. - № 3. - С. 51-55.

7. **Н.В. Чеботарева**, И.Н. Бобкова, Л.В. Козловская. Нефринурия как показатель структурно-функциональных нарушений гломерулярного фильтра у больных протеинурическими формами нефрита// **Клиническая нефрология**. - 2010.- №4. - С. 45-51
8. **Чеботарева Н.В.** Клеточно-молекулярные механизмы нефротоксического действия протеинурии: Монография/ И.Бобкова, Л. Козловская, Н. Чеботарева, Л. Козловская. – Saarbruecken: LAP Lumbert Academic publishing, 2011.-135 с.
9. **Чеботарева Н.В.**, Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Цопанова З.Г. Оценка дисфункции подоцитов по степени нефринурии при протеинурических формах хронического гломерулонефрита// **Терапевтический архив**. - 2011. - №6.- С. 18-23
10. **Чеботарева Н.В.**, Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Ли О.А. Значение нарушений механизмов самозащиты почки при хроническом гломерулонефрите// **Клиническая нефрология**. - 2011. - №1. - С. 8-14
11. Бобкова И.Н., **Чеботарева Н.В.**, Козловская Л.В., Непринцева Н.В. Защитное действие белков теплового шока при заболеваниях почек// **Клиническая нефрология**. - 2011. - № 6. - С. 59 – 66
12. Shvetsov M., Bobkova I., Zheng A., Li O., **Chebotareva N.**, Kamyshova E., Rudenko T. Urinary excretion of vascular endothelial growth factor (VEGF), carbonic anhydrase IX (CA 9) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in patients with chronic glomerulonephritis (CGN): association with clinical activity and renal function// **Nephrology Dialysis Transplantation**. – 2011. -F 283
13. **Tchebotareva N.**, Bobkova I., Kozlovskaya L., Li O. Nephrinuria as a feature of podocyte dysfunction and sensitive indicator of chronic glomerulonephritis (CGN) prognosis. // **Nephrology Dialysis Transplantation**. – 2011. -F 233
14. Козловская Л.В., Бобкова И.Н., **Чеботарева Н.В.**, Фомин В.В., Рощупкина С.В.. Нефротический криз – неотложное состояние у больных с нефротическим синдромом// **Терапевтический архив**. - 2012. - № 6. - С.68-73
15. **Чеботарева Н.В.**, Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Еськова О.А., Варшавский В.А., Голицына Е.П.. Мочевые маркеры подоцитарной дисфункции в оценке прогноза хронического гломерулонефрита// **Современная медицинская наука**. - 2012г. - № 1.- С. 81-93
16. **Tchebotareva N.**, Bobkova I., Kozlovskaya L., Li O., Eskova O., Shvetsov M, Golytsina E., Varshavskiy V., Popova O. Assessment of podocyte dysfunction and urinary podocyte loss in chronic glomerulonephritis (CGN) for estimation of glomerular damage and

- glomerulosclerosis risk// Nephrology Dialysis Transplantation. – 2012. – V.27. – s 2. – P. 182-196. - FP 375, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs223>
17. **Tchebotareva N.**, LI O., Bobkova I, Kozlovskaya L., Varshavskiy V., Golicina E. Extravascular effects of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in patients with chronic glomerulonephritis (CGN): important mechanism of the renal tubulointerstitial fibrosis (TIF) and potential target for its treatment. Nephrology Dialysis Transplantation. – 2012. – V.27. – s 2. – P. 182-196. - FP 372, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs223>
 18. Бобкова И.Н., **Чеботарева Н.В.**, Козловская Л.В., Непринцева Н.В. Система самозащиты почки: современный взгляд на механизмы, определяющие течение и исход гломерулонефрита// Нефрология и диализ. - 2013. - № 3 (15). - С. 174-183
 19. **Чеботарева Н.В.** Непринцева Н.В., Бобкова И.Н., Еськова О.А., Козловская Л.В. Определение уровня в моче маркеров повреждения и факторов самозащиты подоцитов у больных хроническим гломерулонефритом// **Клиническая нефрология.** - 2013г. - № 4.- С. 33-37
 20. Бобкова И.Н., **Чеботарева Н.В.**, Еськова О.А., Козловская Л.В. Экскреция с мочой маркеров подоцитарной дисфункции у больных хроническим гломерулонефритом// **Нефрология и диализ.** - 2013г.- №15(4). - С. 263-268
 21. Козловская Л.В., Бобкова И.Н., Нанчикеева М.Л., **Чеботарева Н.В.**, Ли О.А., Плиева О.К. Общие молекулярно-клеточные механизмы ремоделирования почек и сердца при хронической болезни почек - мишень нефрокардиопротекции// Терапевтический архив. - 2013г.- №85(6). - С. 66-72
 22. Neprintseva N., **Tchebotareva N.**, Bobkova I., Kozlovskaya L. Clinical significance of heat shock protein 70 (HSP-70) serum level in patients with chronic glomerulonephritis. Nephrology Dialysis Transplantation. – 2013. - Volume 28, number S1. - i412.
 23. Eskova O., Neprintseva N., **Tchebotareva N.**, Bobkova I., Kozlovskaya L. Urinary excretion of podocyte's damage and self-defense factors in patients with chronic glomerulonephritis (CGN). Nephrology Dialysis Transplantation. – 2013. – V.28. - № S1. - 186.
 24. **Чеботарева Н.В.**, Непринцева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Варшавский В.А. Определение белков теплового шока в моче, сыворотке крови и ткани почки: значение в оценке активности и прогноза хронического гломерулонефрита// **Клиническая нефрология.** – 2014. - №5. - С. 6-11.
 25. **Чеботарева Н.В.**, Непринцева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. Исследование белка теплового шока молекулярной массой 70 кД в сыворотке крови и моче у

- больных хроническим гломерулонефритом// **Терапевтический архив.** - 2014. - № 6. - С. 18-23
26. Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Нанчикеева М.Л., **Чеботарева Н.В.**, Ли О.А. Молекулярно-клеточные механизмы и система медиаторов ремоделирования почек и сердца при хронической болезни почек – мишень нефрокардиопротекции// Артериальная гипертензия. - 2014г. - №20(6). - С.492-500
27. **Чеботарева Н.В.**, Бобкова И.Н., Непринцева Н.В., Козловская Л.В. Клиническое значение определения сывороточного и мочевого показателей белка теплового шока-70 у больных хроническим гломерулонефритом//**Альманах клинической медицины.** - 2014. - № 30. - С. 18-24, [doi:10.18786/2072-0505-2014-30-18-24](https://doi.org/10.18786/2072-0505-2014-30-18-24)
28. Neprintseva N., **Tchebotareva N.**, Bobkova I., Kozlovskaya L. Urinary levels of inflammatory, profibrogenic and kidney self-defense factors in patients with chronic glomerulonephritis (CGN). Nephrology Dialysis Transplantation. – 2014. – V.- 29. -№ S3. - P. 445- 446.
29. **Чеботарева Н.В.**, Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Красникова Т.Л., Мухин Н.А. Оценка антипротеинурического действия препарата, блокирующего эффекты моноцитарного хемотаксического протеина-1, у больных хроническим гломерулонефритом// **Клиническая нефрология.** - 2015г.- №4. - С.30-35
30. **Чеботарева Н.В.**, Непринцева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Варшавский В.А.. Исследование протективных белков теплового шока в моче, сыворотке крови и ткани почки у больных хроническим гломерулонефритом//**Нефрология.** - 2015. - 19(2). – С.55-62.
31. Neprintseva N., **Chebotareva N.**, Bobkova I, Kozlovskaya L. Investigation of heat shock protein 70 (Hsp70) in the serum, urine, kidney tissue of patients with chronic glomerulonephritis (CGN)// Nephrology Dialysis Transplantation. – 2015. - V. 30. - s 3. - P.106–107, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv171.08>
32. **Чеботарева Н.В.**, Бобкова И.Н., Непринцева Н.В., Козловская Л.В., Малкандуева З.Т. Мочевые биомаркеры подоцитарного повреждения, значение для оценки течения и прогноза хронического гломерулонефрита// **Терапевтический архив.** - 2015. - №6. – С.34-39
33. **Чеботарева Н.В.**, Непринцева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., З.Т. Малкандуева. Определение маркеров повреждения и факторов самозащиты подоцитов в моче больных хроническим гломерулонефритом// Актуальные вопросы нефрологии, диализа, хирургической гемокоррекции и гемафереза. -2015.- С.110-112

34. **Чеботарева Н.В.**, Непринцева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. Клиническое значение определения белка теплового шока -70 в моче, сыворотке крови и ткани почки у больных хроническим гломерулонефритом // Актуальные вопросы нефрологии, диализа, хирургической гемокоррекции и гемафереза. - 2015. - С.112-113
35. **Chebotareva N**, Neprintseva N, Bobkova I, Kozlovskaja L. Podocytes injury markers in patients with chronic glomerulonephritis (CGN)// Nephrology Dialysis Transplantation.- 2016. – V.31.- s1. – P.106, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw157.21>
36. Bobkova I, **Chebotareva N**, Kozlovskaya L., Shilov E. Edema in renal diseases – current view on pathogenesis// Nephrology @ Point of Care. – 2016. - №2(1). - P.47-55
37. Schukina A.A, Bobkova I.N., **Chebotareva N.V.**, Shestakova M.V. Urinary excretion of nephrin, podocin, and mendin as early markers of diabetic nephropathy// Nephrology Dialysis Transplantation. – 2017. – V.32. – s.3. – P.271, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx149.SP440>
38. **Chebotareva N**, Bobkova I, Neprinzeva N. Heat shock protein 27 and 70 in chronic glomerulonephritis (CGN)// Nephrology Dialysis Transplantation. – 2017. – V.32. - s3. – P.510. – MP299, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx165.MP229>
39. **Chebotareva N.**, Bobkova I, Shilov E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy// Cell Stress Chaperones. – 2017. - №22(3). – P.319-343
40. **Патент 2535612 Российская Федерация**, МПК G01N 33/68, G01N 33/493.
Способ прогнозирования эффективности иммуносупрессивной терапии хронического гломерулонефрита с нефротическим синдромом/ **Чеботарева Н.В.**, Бобкова И.Н., Лысенко Л.В. - №2011104014/15; заяв. 07.02.2011; опубл.20.06.2012, Бюл. №17. – 8с.: ил.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<i>АГ</i>	– артериальная гипертония
<i>БТШ-27</i>	– белки теплового шока с молекулярной массой 27 кДа
<i>БТШ-70</i>	– белки теплового шока с молекулярной массой 70 кДа
<i>ИЛ-6</i>	– интерлейкин 6
<i>ИЛ-10</i>	– интерлейкин 10
<i>ММП-2</i>	– матриксная металлопротеиназа-2
<i>ММП-9</i>	– матриксная металлопротеиназа-9
<i>МН</i>	– мембранозная нефропатия
<i>МСП-1</i>	– моноцитарный хемотаксический протеин-1
<i>МИ</i>	– минимальные изменения
<i>МКГН</i>	– мезангиокапиллярный гломерулонефрит
<i>МезПГН</i>	– мезангиопролиферативный гломерулонефрит
<i>МС</i>	– мочевого синдром
<i>НС</i>	– нефротический синдром
<i>ПН</i>	– почечная недостаточность
<i>СКФ</i>	– скорость клубочковой фильтрации
<i>СПУ</i>	– суточная протеинурия
<i>T_{рег}</i>	– регуляторные Т-лимфоциты
<i>ТИМП</i>	– тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-2
<i>ФСГС</i>	– фокально-сегментарный гломерулосклероз
<i>ХГН</i>	– хронический гломерулонефрит
<i>PDX+</i>	– подокаликсин-позитивный
<i>VEGF</i>	– сосудистый эндотелиальный фактор роста
<i>WT-1</i>	– антиген опухоли Вильмса