

На правах рукописи

БРОВКО  
МИХАИЛ ЮРЬЕВИЧ

**"Клиническое значение сывороточных и мочевых биомаркеров нарушений водно-натриевого обмена при протеинурических формах хронического гломерулонефрита"**

14.01.04 – внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва 2016

Работа выполнена в ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Лысенко-Козловская Лидия Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

- доктор медицинских наук, профессор кафедры трансплантологии, нефрологии и искусственных органов ФУВ ГБУЗ МО МНИКИ им. М.Ф. Владимирского

**Прокопенко Елена Ивановна**

- доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой факультетской терапии им. А.И. Нестерова ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Министерства Здравоохранения РФ **Шостак Надежда Александровна**

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ (127473, г. Москва, ул. Делегатская, дом 20 стр. 1).

Защита состоится «20» октября 2016 года в 13:00 на заседании диссертационного совета Д 212.203.18 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117292, г. Москва, ул. Вавилова, д. 61; ГБУЗ «ГКБ №64 ДЗМ»).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 212.203.18:

доктор медицинских наук, профессор

Киякбаев Г.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Среди механизмов реализации водно-электролитного гомеостаза в организме важную роль отводят его эффекторному звену – почкам. Расшифровка особенностей функционирования системы селективного транспорта жидкости через стенку почечных канальцев при состояниях, сопровождающихся нарушениями водно-электролитного баланса: хронической сердечной недостаточности (ХСН), циррозе печени (ЦП), поражении почек – в последние годы вызывает пристальный интерес исследователей.

При поражении почек, в частности одной из наиболее клинически значимых его форм – хроническом гломерулонефрите (ХГН), протекающем с выраженной протеинурией (ПУ) или нефротическим синдромом (НС) и отеками, изучение этого вопроса представляется особенно важным, поскольку именно степень ПУ/НС характеризует клиническую активность заболевания и отражает выраженность иммунного воспаления и фиброзного ремоделирования ткани почки, включая тубуло-интерстициальный ее компонент (Козловская Л.В., Мухин Н.А., 2005).

В эксперименте показано, что гиперпродукция антидиуретического гормона (АДГ) - центрального регулятора водно-натриевого баланса, сопровождается в физиологических условиях и, например, при ХСН, пропорциональным увеличением количества белков водных каналов – аквапоринов второго типа (АКП-2) на апикальной мембране клеток собирательных трубочек (Nielsen S., 1997; Xu DL, 1997). В отличие от этого, при НС прямой зависимости между уровнями АДГ и АКП-2 не наблюдается, а напротив повышение выработки АДГ сопровождается угнетением активности АКП-2 (Apostol E., 1997), свидетельствуя, по-видимому, о существовании при ХГН с НС принципиально иного механизма реализации оси АДГ-АКП-2. В клинических условиях изучение особенностей метаболизма АДГ и его эффекторного звена в почках у больных с протеинурическими формами ХГН не проводилось.

В качестве причины феномена «ускользания» от действия АДГ в почке при НС рассматривают уменьшение чувствительности к нему АДГ-рецепторов в условиях нарастающей ПУ и/или выраженного тубулоинтерстициального фиброза (ТИФ). Данное предположение согласуется с установленной в настоящее время многофункциональностью клеток почечного канальцевого эпителия: наряду с выполнением их основной функции реабсорбции натрия и воды, также и участие (через сеть паракринных цитокиновых реакций) в развитии тубулоинтерстициального воспаления и фиброза (Бобкова И.Н., 2006). В связи с этим заслуживают внимания результаты новых экспериментальных исследований: при формировании ПУ и ТИФ

происходит повышение экспрессии молекулы повреждения КИМ-1 в проксимальном канальце (Benjamin D., 2013) и одновременное угнетение экспрессии гена АКП-2 в дистальном отделе нефрона (Apostol E., 1997).

Высказывается мнение о том, что синтезируемый в канальцевом эпителии КИМ-1 может функционировать подобно моноцитарному хемоаттрактантному белку - MCP-1, участвуя в синтезе экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и формировании ТИФ. Предполагаемая связь почечной продукции КИМ-1 и нарушений регуляции водно-натриевого метаболизма с выраженностью ПУ/НС и ТИФ позволяет допустить возможность использования биомаркеров, характеризующих эти нарушения, в оценке активности и прогноза ХГН.

### **Цель исследования**

Охарактеризовать особенности нарушения в регуляторном звене водно-натриевого метаболизма – АДГ/АКП-2, и изменения почечной экскреции молекулы повреждения КИМ-1 у больных протеинурическими формами ХГН, определить значение этих биомаркеров в оценке активности и прогноза заболевания.

### **Задачи исследования**

1. У больных протеинурическими формами ХГН изучить продукцию АДГ по уровню в сыворотке крови его суррогатного маркера – С-концевого фрагмента промолекулы АДГ – копептина, в зависимости от степени клинической активности нефрита, сравнить выявленные изменения с результатами изучения уровня копептина у больных ХГН, протекающего с ведущим синдромом гематурии (ГУ).
2. Оценить в сравниваемых группах больных экскрецию с мочой АКП-2, сопоставить ее уровень с сывороточным уровнем копептина и на этом основании выявить особенности функционирования регуляторного звена водно-натриевого обмена – оси АДГ/АКП-2 в условиях высокой ПУ/НС.
3. Определить наличие и уровень экскреции с мочой больных молекулы повреждения почки КИМ-1, оценить соотношение изменений этого мочевого биомаркера с выраженностью изменений сывороточного уровня копептина и мочевой экскреции АКП-2 а также с клинико-морфологическими критериями активности/тяжести ХГН для подтверждения связи нарушений функции регуляторного звена АДГ/АКП-2 со степенью ТИФ, опосредованного КИМ-1.
4. На основании анализа выявленных взаимосвязей определить возможность использования биомаркеров – сывороточного уровня копептина и мочевой экскреции АКП-2 и уровня мочевой экскреции молекулы повреждения КИМ-1 как критериев прогноза течения протеинурических форм ХГН.

### **Научная новизна**

Впервые в клинических условиях у больных с активными протеинурическими формами ХГН, протекающими с высокой ПУ/НС, изучены особенности функционирования системы регуляции водно-натриевого обмена оси АДГ/АКП-2. В результате подтверждены полученные в эксперименте данные о нарушении при НС эффекторного (почечного) звена этой системы, что проявляется отсутствием пропорционального степени гиперпродукции АДГ увеличения количества АКП-2 в дистальном отделе нефрона, о чем свидетельствует статистически значимое снижение экскреции АКП-2 с мочой этих больных.

У больных клинически наиболее активными протеинурическими формами ХГН, особенно при сочетании НС и почечной дисфункции, впервые установлена взаимосвязь между нарушениями АДГ-зависимой регуляции водно-натриевого метаболизма и величиной экскреции с мочой молекулы повреждения КИМ-1. Обнаружена взаимосвязь высокого уровня экскреции КИМ-1 с низким уровнем экскреции АКП-2 с мочой и выраженностью ТИФ в нефробиоптате, что свидетельствует о патогенетической роли локально-почечной гиперпродукции КИМ-1 в развитии этих нарушений при ХГН.

На основании выявленной тесной корреляции мочевых показателей КИМ-1 и АКП-2 с клиническими признаками активности протеинурических форм ХГН обоснована возможность использования этих биомаркеров в оценке прогноза течения ХГН.

### **Практическая значимость**

Проведенное исследование изменений сывороточного уровня суррогатного маркера АДГ – копептина, экскреции с мочой АКП-2 и молекулы повреждения КИМ-1 у больных протеинурическими формами ХГН разной степени клинической активности позволила оптимизировать подходы к оценке риска прогрессирования ХГН, выделив новые неинвазивные диагностические биомаркеры, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. У больных протеинурическими формами ХГН в отличие от больных ХГН с гематурией и здоровых лиц выявляются изменения уровня в сыворотке крови суррогатного маркера АДГ – копептина, и экскреции с мочой белка водного канала – АКП-2, характер и степень которых зависят от особенностей клинического течения ХГН. Наиболее высокий сывороточный уровень копептина и низкий уровень мочевой экскреции АКП-2 наблюдаются у больных клинически активным нефритом с НС, особенно с почечной дисфункцией, свидетельствуя о значении нарушений в системе АДГ/АКП-2 как маркеров тяжести повреждения почек при ХГН.

2. У больных протеинурическими формами ХГН отмечается повышение экскреции с мочой молекулы повреждения КИМ-1, уровень которой прямо коррелирует со степенью клинической активности/тяжести течения ХГН – величиной ПУ/НС, особенно в сочетании с почечной дисфункцией, и обратно коррелирует с уровнем экскреции с мочой АКП-2, что подтверждает роль КИМ-1 в дисрегуляции водно-натриевого обмена при ХГН через участие в процессах формирования ТИФ.
3. Высокий уровень мочевой экскреции молекулы повреждения КИМ-1 у больных ХГН с НС с большой доказательностью (высокой чувствительностью и специфичностью) позволяет предсказать дальнейшую персистенцию и рефрактерность к терапии НС, подтверждая возможность практического использования этого неинвазивного теста для оценки прогноза течения ХГН.

### **Внедрение результатов работы в практику**

Результаты используются в работе нефрологического отделения УКБ№3 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, в учебном процессе на кафедре внутренних, профессиональных заболеваний и пульмонологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, кафедре нефрологии и гемодиализа ФППОВ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, кафедре внутренних болезней ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 2 печатные работы в журналах Высшей Аттестационной Комиссии (ВАК).

### **Апробация работы**

Апробация работы состоялась 13 апреля 2016 г. на заседании кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии МПФ, кафедры нефрологии и гемодиализа ФППОВ Первого МГМУ им. И.М.Сеченова и врачей УКБ №3 (Клиника нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний им. Е. М. Тареева).

### **Личный вклад автора**

Автором лично проведены планирование работы, поиск и анализ литературы по теме диссертации, набор пациентов, клиническое обследование больных, формирование базы данных, статистическая обработка, обобщение и анализ полученных результатов. Автором освоены методика определения суррогатного маркера АДГ - копептина в сыворотке крови и биомаркеров АКП-2 и КИМ-1 в моче методом ELISA. Автор непосредственно участвовал во всех этапах исследования от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и внедрения в практику.

## **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.04 - "внутренние болезни". Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно - пунктам 2,4,6 и 11 паспорта внутренние болезни.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 92 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственного исследования, выводов и практических рекомендаций, таблиц и диаграмм. Список литературы содержит 139 источников, из них 25 отечественных.

## **База проведения исследования**

Клиническое исследование проводилось на базе Кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии медико-профилактического факультета Первый МГМУ им И.М.Сеченова в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М.Тареева (заведующий кафедрой и директор Клиники – академик РАН, д.м.н., профессор Н.А.Мухин) УКБ№3 (главный врач к.м.н. В.В.Панасюк). Выражаю искреннюю благодарность всем сотрудникам кафедры и Клиники за содействие в проведении работы.

## **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Материалы и методы исследования**

#### **1. Характеристика больных.**

Обследовано 47 больных ХГН: 19 женщин (40%) и 28 мужчин (60 %) в возрасте от 17 до 62 лет (в среднем  $38,1 \pm 13,9$  лет), наблюдавшихся в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М.Тареева, УКБ № 3, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России с 2011 по 2013 годы.

Среди 47 обследованных больных ХГН диагноз был подтвержден морфологически у 27 пациентов: у 10 выявлен мембранозный гломерулонефрит (МГН), у 7 – фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), у 2 - мезангиокапиллярный гломерулонефрит (МКГН), у 6 - мезангиопролиферативный гломерулонефрит (МПГН), у 2 - нефрит с минимальными изменениями - МИГН (по классификации Серова В.В., 1980 год).

Критериями исключения из исследования были признаки активной мочевой инфекции, сопутствующий сахарный диабет, тяжелая артериальная гипертензия (АГ), ожирение ( $ИМТ > 30 \text{ кг/м}^2$ ), вирусные гепатиты, системные заболевания.

Клиническое обследование больных проводилось по принятому в нефрологическом отделении плану, включающему клиническое и биохимическое исследования крови, мочевые тесты, ультразвуковое исследование почек с определением их размеров и толщины паренхимы, ультразвуковое исследование сердца.

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) определяли по клиренсу эндогенного креатинина (проба Реберга-Тареева) и расчетным методом по формуле СКД-ЕРІ. В исследование не включались пациенты с хронической болезнью почек (ХБП) 4 и 5 стадии.

Результаты исследования биомаркеров сравнивали в трех группах пациентов протеинурическими формами ХГН (группы I, II и III), различающихся по степени активности ХГН. Отдельно рассматривались больные с иной по механизму развития формой ХГН – с ГУ (группа IV). Больные этой группы были сопоставимы по полу и возрасту с другими группами больных ХГН.

В группу I вошли 10 больных с НС: отечный синдром различной степени выраженности и локализации, ПУ, достигавшая в отдельных случаях 12-13 г/сут. (в среднем  $8,74 \pm 3,03$  г/сут.), гипоальбуминемия ( $24,17 \pm 3,95$  г/л), гиперхолестеринемия ( $11,47 \pm 3,25$  ммоль/л). Эритроцитурия по методу Нечипоренко составляла  $8500 \pm 2200$  в 1 мл (от 2000 до 15000 в 1 мл). Кроме того, наряду с НС критерием включения в группу I было снижение функции почек. У этих больных креатинин сыворотки составлял  $1,75 \pm 1,45$  мг/дл (от 1,30 мг/дл до 2,44 мг/дл), расчетная СКФ  $45,5 \pm 14,0$  мл/мин (от 66 мл/мин до 30 мл/мин) по формуле СКД-ЕРІ. Почечная недостаточность (ПН) не являлась проявлением хронической ПН (сморщенная почка), а в сочетании с НС, повышенным уровнем острофазовых показателей (СОЭ, С-реактивный белок, фибриноген) расценивалась нами как признак высокой активности ХГН и чаще имела преходящий характер. Среди пациентов этой группы у 5, кому была проведена биопсия почки, выявлен выраженный ТИФ. У всех больных наблюдалась АГ - САД  $149,4 \pm 7$  мм рт.ст. (от 135 до 160 мм рт.ст.), ДАД  $108,6 \pm 7$  мм рт.ст. (от 100 до 115 мм рт.ст.).

В группу II вошли 16 больных с НС и нормальной функцией почек: выраженная суточная ПУ ( $8,4 \pm 4,9$  г/сут.), гипоальбуминемия ( $24,8 \pm 4,9$  г/л), гиперхолестеринемия ( $10,0 \pm 2,8$  ммоль/л), сывороточный креатинин ( $0,67 \pm 0,12$  мг/дл), расчетная СКФ более 90 мл/мин по формуле СКД-ЕРІ. Эритроцитурия по методу Нечипоренко составляла в среднем  $2700 \pm 1400$  в 1 мл (от 500 до 5000 в 1 мл). У больных выявлялась только мягкая АГ (САД  $133,7 \pm 5$  мм рт.ст., ДАД -  $85,5 \pm 4$  мм рт.ст.).

Группа III представлена 10 пациентами с частичной ремиссией НС: отсутствовали отеки, ПУ субнефротического уровня ( $2,08 \pm 0,86$  г/сут.), сывороточные концентрации альбумина и холестерина в пределах нормальных значений, функция почек сохранна. Число эритроцитов в 1 мл мочи не превышало 8000. Отсутствовала АГ (САД  $115,6 \pm 4$  мм

рт.ст., ДАД  $74,5 \pm 6$  мм рт.ст.).

В группу IV вошли 11 пациентов с небольшой ПУ ( $0,79 \pm 0,99$  г/сут.), и наличием ГУ  $95000 \pm 14000$  в 1 мл (от 50000 до 120000 в 1 мл по Нечипоренко). Сывороточная концентрация альбумина и креатинина были в пределах нормальных значений (альбумин сыворотки  $41,3 \pm 3,9$  г/л, креатинин сыворотки  $0,92 \pm 0,18$  мг/дл). У пациентов группы IV значения САД составляли  $130,2 \pm 5$  мм рт.ст. (от 117 до 145 мм рт.ст.), ДАД –  $82,5 \pm 6$  мм рт.ст. (от 70 до 90 мм рт.ст.)

Длительность течения ХГН во всех группах больных была сопоставима и в среднем составляла 1,5 года.

Контрольная группа состояла из 9 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с больными ХГН: 3 мужчин и 6 женщин от 22 до 62 лет (средний возраст  $45,9 \pm 14,5$  лет).

Ни в одной из изученных групп не выявлено значимого снижения либо повышения сывороточной концентрации натрия (соответственно  $146,3 \pm 3,7$ ,  $143,9 \pm 2,9$ ,  $145,6 \pm 2,9$ ,  $143,8 \pm 1,5$  ммоль/л, в контроле -  $144,2 \pm 1,8$  ммоль/л,  $p > 0,05$ ), в том числе у больных группы I со сниженной СКФ, у кого отмечена лишь тенденция к нарастанию натриемии. Поскольку все исследованные показатели, в том числе биомаркеры АКП-2 и КИМ-1, оценивались в разовой утренней порции мочи, забираемой одновременно с сывороткой крови, то натрийурез определялся не в суточной моче, а в утренней ее порции для более корректного сравнения с изучаемыми биомаркерами.

Концентрация натрия в разовой (утренней) порции мочи у пациентов группы I с активным НС и сниженной СКФ была достоверно ниже ( $65,1 \pm 26,0$  ммоль/л), чем у пациентов группы III с неполной ремиссией НС ( $113,1 \pm 36,1$  ммоль/л,  $p < 0,05$ ). Разница с остальными группами, в том числе контрольной, не достигла статистической значимости ( $p > 0,05$ ), что возможно объясняется малым количеством пациентов в представленной группе.

Как один из критериев активности воспаления нами был оценен уровень сывороточной концентрации острофазового белка – фибриногена, который оказался повышенным во всех группах больных, в том числе и ХГН с ГУ. Наиболее высокий в нашем наблюдении уровень фибриногена выявлен у больных с НС (группы 1 и 2): соответственно  $6,79 \pm 2,21$  г/л и  $5,82 \pm 1,68$  г/л, достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у больных III и IV групп (соответственно  $3,86 \pm 1,63$  и  $4,68 \pm 1,44$ ) и в контроле ( $2,71 \pm 0,78$ ).

В качестве дополнительного параметра, характеризующего фильтрационную функцию почек, был использован сывороточный уровень цистатина С. Было выявлено сопоставимое с сывороточным уровнем креатинина распределение этого показателя среди больных групп I-IV:  $2412 \pm 549$  нг/мл,  $1453 \pm 387$  нг/мл,  $1606 \pm 286$  нг/мл,  $1590 \pm 762$  нг/мл, соответственно, и нормальный уровень цистатина С в контрольной группе –  $1182 \pm 179$  нг/мл.

## **2. Специальные методы исследования.**

У большинства (30) больных, поступивших по поводу обострения ХГН, взятие образцов крови и мочи для исследования биомаркеров проводили до начала активной иммуносупрессивной терапии и до назначения диуретиков, у части из них проводился повторный забор. Меньшую часть больных, имеющих неполную ремиссию НС, обследовали во время уже начатой иммуносупрессивной терапии. В лечении использовали современные стандартные схемы, включавшие глюкокортикостероиды внутрь или внутривенно и/или циклофосфамид внутривенно, а также циклоспорин А и, менее часто, препараты микофеноловой кислоты.

Активность АДГ оценивали по сывороточной концентрации его суррогатного маркера – копептина (как более устойчивой молекулы). Для этого у больных натошак забирали 5 мл венозной крови в сухую пластиковую пробирку, затем центрифугировали для отделения сыворотки. Полученную сыворотку до постановки проб хранили в замороженном состоянии при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для исследования мочевой экскреции АКП-2 и КИМ-1 у больных производили забор 10 мл утренней мочи в сухие пластиковые пробирки и центрифугировали (при 1500 об./мин) в течение 5 минут с целью удаления клеток мочевого осадка, затем забирали надосадочный слой мочи, который до исследования замораживали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Исследование всех биомаркеров выполняли методом иммуноферментной реакции с использованием реактивов фирм «Phoenix Pharmaceuticals», «R&D Systems», «USCN Life Science Inc.», США.

Автор выражает благодарность за помощь в проведении этих исследований сотрудникам межклинической иммунологической лаборатории ПМГМУ им. И.М.Сеченова (зав. лабораторией Серова А.Г.).

Изучение биопсийного материала почки проведено на кафедре патологической анатомии ПМГМУ им. И.М.Сеченова профессором В.А. Варшавским и к.м.н. Е.П. Голицыной, за что автор выражает им искреннюю благодарность.

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

Для статистического анализа полученных данных был использован пакет прикладных программ STATISTICA 6,0 и SPSS 11.5. На основании критериев Шапиро-Вилка было оценено нормальное распределение исследуемых показателей. При сравнении параметров, имевших ненормальное распределение, использовали критерий Манна-Уитни или критерий Крускала-Уоллиса. Определяли медиану, разброс величин по отношению к медиане по показателю интерквартильного размаха (25-й, 75-й процентиля). В тексте работы все значения представлены в виде медианы, в фигурных скобках указан

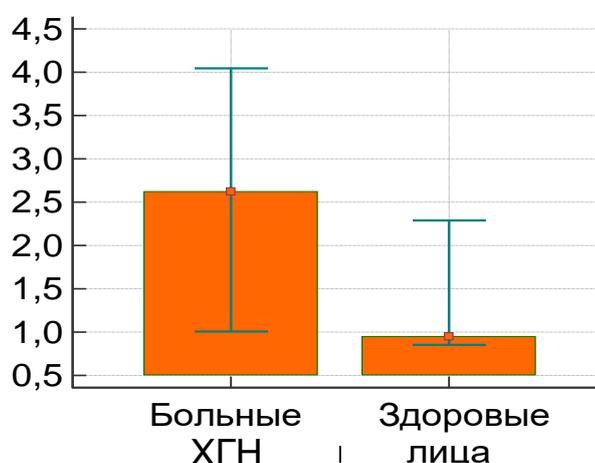
интерквартильный размах. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости для всех статистических данных принимали равным 0,05.

Прогностическое значение концентрации изученных биомаркеров оценивали при помощи построения ROC- кривой.

## Результаты исследования и их обсуждение

### 1. Уровень копептина в сыворотке больных ХГН.

Оценка уровня копептина в сыворотке крови обследованных больных ХГН и здоровых лиц показала, что у больных ХГН (группы I, II, III, IV) в среднем он был выше (2,62 {1,01-4,05} нг/мл), чем в контрольной группе (0,95 {0,85-2,28} нг/мл,  $p < 0,05$ ). (рис. 1).



**Рисунок 1. Уровень копептина в сыворотке крови больных ХГН и здоровых людей (контроль).**

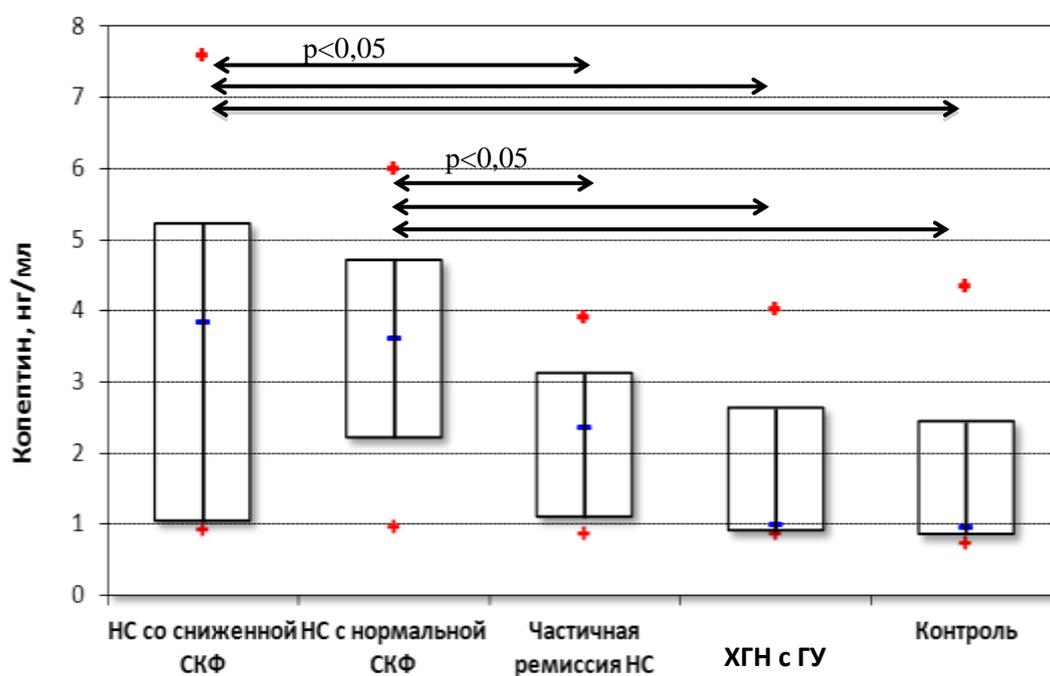
Сывороточный показатель копептина у больных протеинурическими формами ХГН (группы I, II, III) был достоверно выше, чем у больных с ГУ (группа IV), (соответственно 2,93 {1,66-4,57} и 0,99 {0,92-2,36} нг/мл,  $p < 0,05$ ).

У больных протеинурическими формами ХГН этот показатель характеризовался вариабельностью и был достоверно выше в группах больных с НС с нарушением и без нарушения функции почек (группы I и II), чем у больных с частичной ремиссией НС (группа III), ХГН с ГУ (группа IV) и контрольной группой ( $p < 0,05$ ) (Табл. 1), причем у больных ХГН с ГУ он практически не отличался от контрольной группы ( $p > 0,05$ ). Несмотря на более высокий средний показатель уровня копептина у пациентов с частичной ремиссией НС (группа III), различия с группой IV и контролем оказались статистически незначимыми ( $p > 0,05$ ) (Табл. 1, рис. 2).

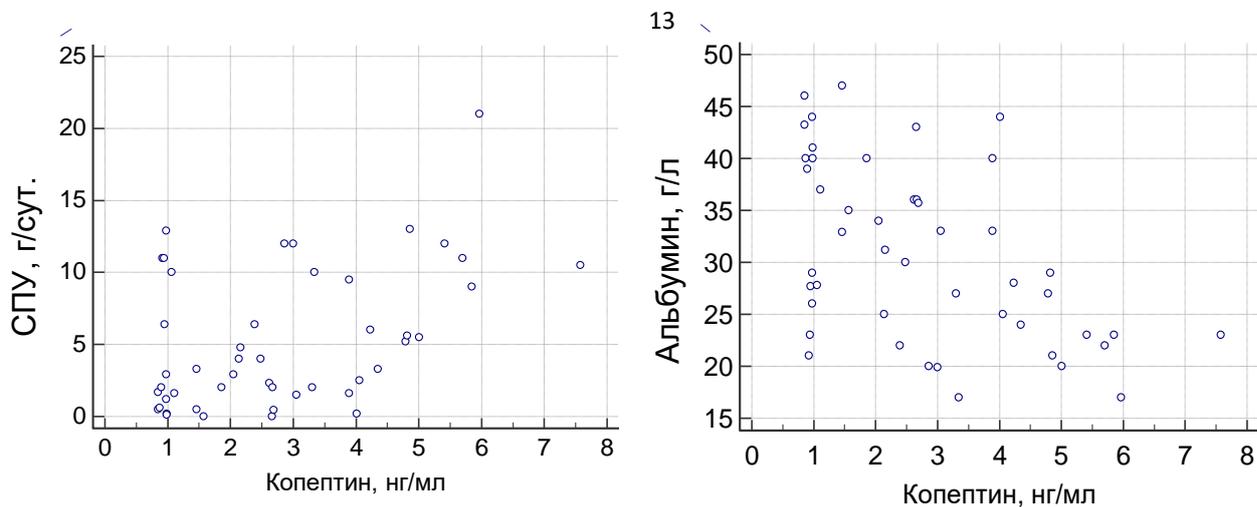
Таблица 1 и рисунок 2. Уровень копейтина в сыворотке крови больных различными клиническими формами ХГН.

Группы (N=47)	Копептин, нг/мл	Достоверность (P)
I - НС, с нарушением функции почек (n=10)	3,83 {1,03-5,22}*	p I-к<0,05 p I-II>0,05 p I-III<0,05 p I-IV<0,05
II - НС, без нарушения функции почек (n=16)	3,62 {2,20-4,70}	p II-к<0,05 p II-III<0,05 p II-IV<0,05
III - Частичная ремиссия НС (n=10)	2,36 {1,08-3,11}	p III-к >0,05
IV - ХГН с ГУ (n=11)	0,99 {0,9-2,62}	p IV-к >0,05
Контроль (n=9)	0,95 {0,85-2,44}	p К-I,II,III,IV <0,05

\*Результаты представлены в виде медианы, в скобках указаны 25 и 75 процентиля.



Установлена сильная обратная корреляция между уровнем в сыворотке крови копейтина и сывороточным уровнем альбумина ( $R_s = -0,51$ ;  $p = 0,0003$ ), прямая корреляция между сывороточным уровнем копейтина и величиной суточной ПУ ( $R_s = 0,46$ ;  $p = 0,0017$ ) (рис. 3). Отмечена слабая достоверная корреляция между уровнем копейтина и общим холестерином сыворотки ( $R_s = 0,35$ ;  $p = 0,02$ ). В то же время, не выявлено корреляции между сывороточным уровнем копейтина и ГУ ( $R_s = 0,12$ ;  $p = 0,19$ ).

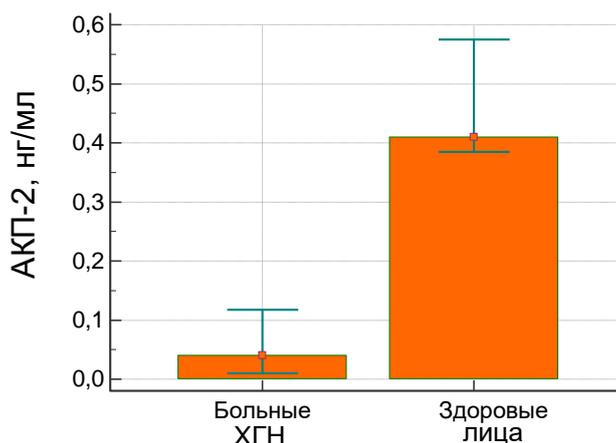


**Рисунок 3.** Уровень креатинина в сыворотке крови больных ХГН в зависимости от показателя суточной ПУ и альбумина сыворотки.

Корреляций между сывороточным уровнем креатинина и показателями натриевого обмена (концентрацией натрия в сыворотке ( $R_s=0,19$ ;  $p=0,17$ ) и в разовых порциях мочи ( $R_s=-0,21$ ;  $p=0,42$ ) выявлено не было. Также не была установлена корреляция между сывороточным уровнем креатинина и показателями креатинина и цистатина С сыворотки, между уровнем креатинина в сыворотке и концентрацией фибриногена (как показателем активности ХГН).

## 2. Уровень экскреции АКП-2 с мочой больных ХГН.

Оценка уровня АКП-2 в моче больных ХГН и здоровых лиц показала, что у больных ХГН (группы I-IV) в среднем он был значительно ниже ( $0,04 \{0,010-0,118\}$  нг/мл), чем в контрольной группе ( $0,41 \{0,385-0,575\}$  нг/мл,  $p<0,0001$ ) (рис. 4).



**Рисунок 4.** Уровень АКП-2 в моче больных ХГН и здоровых людей (контроль).

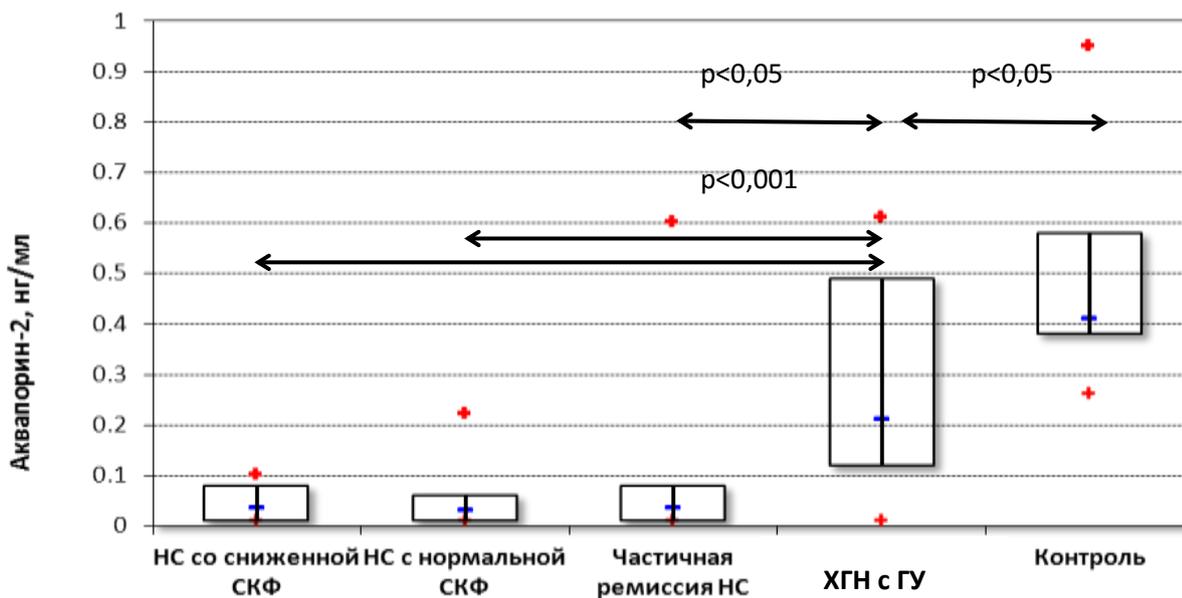
У больных протеинурическими формами (группы I,II,III) он был достоверно ниже, чем у больных ХГН с ГУ (группа IV), (соответственно  $0,03 \{0,010-0,075\}$  и  $0,21 \{0,123-0,455\}$  нг/мл,  $p<0,0001$ ).

Уровень экскреции АКП-2 у больных активным НС как с наличием признаков нарушения функции почек (группы I и II,  $p < 0,001$ ), так и с частичной ремиссией НС (группа III,  $p < 0,05$ ) был ниже, чем у больных ХГН с ГУ (группа IV). Но при этом экскреция АКП-2 у больных ХГН с ГУ была достоверно меньше по сравнению с контрольной группой (Табл. 2, рис. 5).

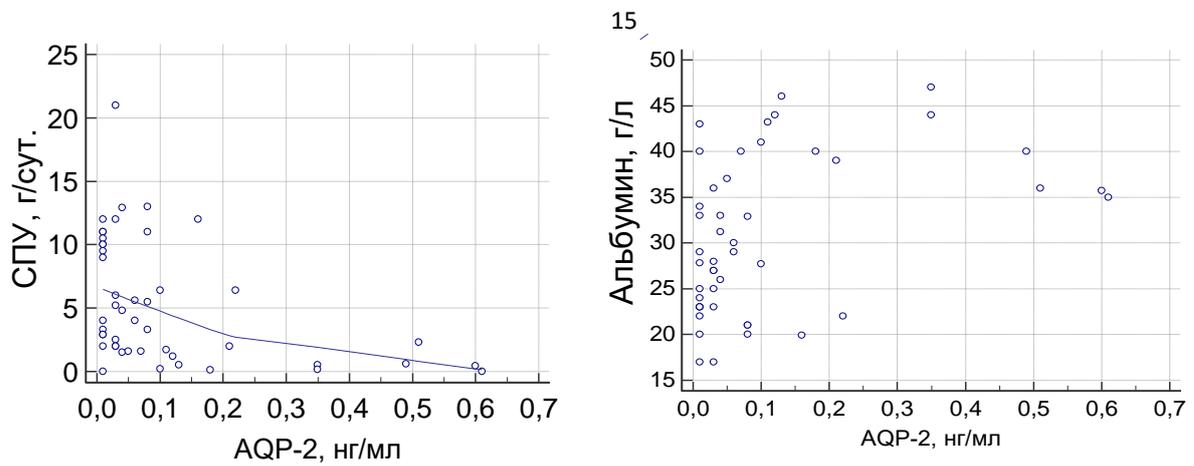
**Таблица 2 и рисунок 5. Уровень АКП-2 в моче больных различными клиническими формами ХГН.**

Группы (N=47)	АКП-2, нг/мл	Достоверность (P)
<b>I - НС, с нарушением функции почек (n=10)</b>	0,035 {0,01-0,08}*	p I-к<0,001 p I-II>0,05 p I - III>0,05 p I-IV<0,001
<b>II - НС, без нарушения функции почек (n=16)</b>	0,03 {0,01-0,06}	p II-к<0,001 p II-IV<0,001 p II-III>0,05
<b>III - Частичная ремиссия НС (n=10)</b>	0,035 {0,01-0,08}	p III-к<0,001 p III-IV<0,05
<b>IV – ХГН с ГУ (n=11)</b>	0,21 {0,12-0,49}	p IV-к<0,05
<b>Контроль (n=9)</b>	0,41 {0,38-0,58}	p К-I,II,III,IV <0,001

\*Результаты представлены в виде медианы, в скобках указаны 25 и 75 перцентили.



Установлена прямая корреляция между уровнем в моче АКП-2 и уровнем в сыворотке альбумина ( $R_s = 0,41$ ;  $p = 0,005$ ), общего белка ( $R_s = 0,35$ ;  $p = 0,013$ ), и обратная корреляция между мочевым уровнем АКП-2 и величиной СПУ ( $R_s = -0,43$ ;  $p = 0,001$ ) (рис. б); достоверной корреляции с ГУ не выявлено.



**Рисунок 6. Уровень АКП-2 в моче больных ХГН (группы I-IV) в зависимости от показателя суточной ПУ и альбумина сыворотки.**

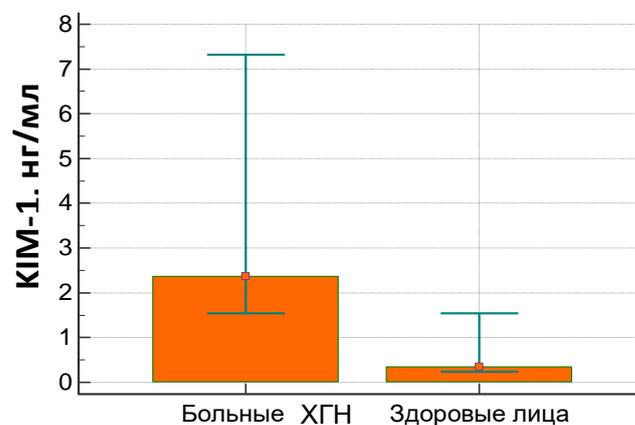
Корреляций между уровнем АКП-2 в моче и показателями натриевого обмена (концентрацией натрия в сыворотке ( $R_s=0,25$ ;  $p>0,05$ ) и в разовых порциях мочи ( $R_s=-0,06$ ;  $p>0,05$ )) выявлено не было. Также не была установлена корреляция между мочевым уровнем АКП-2 и показателем креатинина сыворотки. ( $R_s=-0,06$ ;  $p=0,35$ ), а также концентрацией цистатина С в сыворотке крови обследованных больных. ( $R_s=-0,16$ ;  $p=0,27$ ).

Обратило на себя внимание отсутствие корреляции между мочевым уровнем АКП-2 и сывороточным уровнем копептина. ( $R_s=-0,19$ ;  $p=0,46$ ).

В то же время, выявлена достоверная корреляция между уровнем АКП-2 в моче и сывороточным уровнем фибриногена ( $R_s=-0,34$ ;  $p=0,01$ ).

### 3. Уровень экскреции молекулы повреждения КИМ-1 с мочой у больных ХГН.

Оценка уровня КИМ-1 в моче больных ХГН и здоровых лиц показала, что у больных ХГН в среднем он был значительно выше (2,37 {1,54-7,32} нг/мл), чем в контрольной группе (0,35 {0,245-1,545} нг/мл,  $p<0,0001$ ) (Рис 7).



**Рисунок 7. Уровень экскреции молекулы повреждения КИМ-1 с мочой у больных ХГН и здоровых людей (контроль).**

У больных протеинурическими формами ХГН (группы I,II,III) он был достоверно выше, чем у больных ХГН с ГУ (группа IV), (соответственно 3,085 {1,855-8,52} и 0,96 {0,518-2,362} нг/мл,  $p=0,01$ )

При анализе экскреции с мочой молекулы повреждения КИМ-1 в различных группах больных ХГН самые высокие значения получены в группе больных с НС и снижением функции почек, в то же время больные с НС и стабильной функцией почек, так же как и с частичной ремиссией НС, по этому показателю достоверно не различались. Наименьшие значения получены в группе больных ХГН с ГУ и в контрольной группе, разница между этими группами статистически незначима ( $p>0,05$ ).

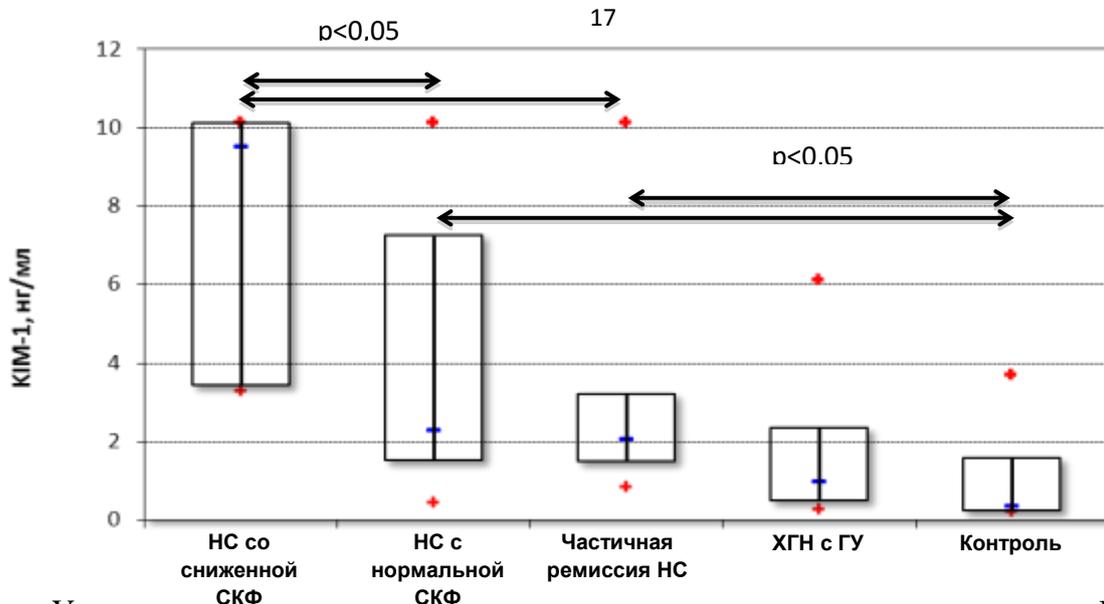
В то же время выявлено достоверное отличие по уровню мочевого экскреции КИМ-1 в группе пациентов с НС и сохранной функции почек от группы ХГН с ГУ. Статистически значимой разницы между группой пациентов с частичной ремиссией НС и ХГН с ГУ выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

При этом все группы пациентов с протеинурическими формами ХГН статистически значимо отличались по уровням мочевого экскреции КИМ-1 от контрольной группы ( $p<0,05$ ) (Табл. 3, Рис. 8).

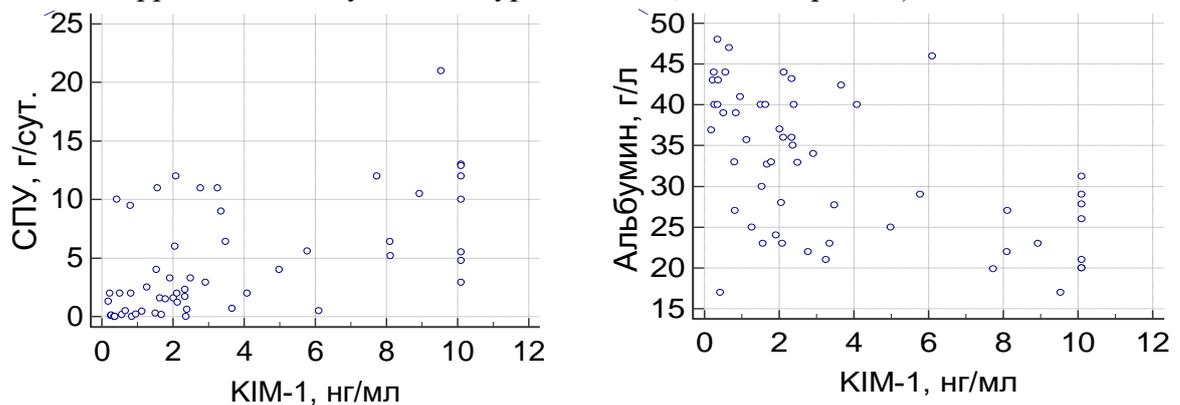
**Таблица 3 и рисунок 8. Уровень молекулы повреждения КИМ-1 в моче больных различными клиническими формами ХГН.**

Группы (N=47)	КИМ-1, нг/мл	Достоверность (P)
<b>I - НС, с нарушением функции почек (n=10)</b>	9,52 {3,45-10,1}*	p I-к<0,05 p I-II<0,05 p I-III<0,05 p I-IV<0,05
<b>II - НС, без нарушения функции почек (n=16)</b>	2,29 {1,54-7,24}	p II-к<0,05 p II-III>0,05 p II-IV<0,05
<b>III - Частичная ремиссия НС (n=10)</b>	2,06 {1,51-3,21}	p III-к<0,05 p III-IV>0,05
<b>IV - ХГН с ГУ (n=11)</b>	0,96 {0,5-2,37}	p IV-к >0,05
<b>Контроль (n=9)</b>	0,35 {0,24-1,59}	p К-I,II,III <0,05 p К-IV > 0,05

\*Результаты представлены в виде медианы, в скобках указаны 25 и 75 процентиля.

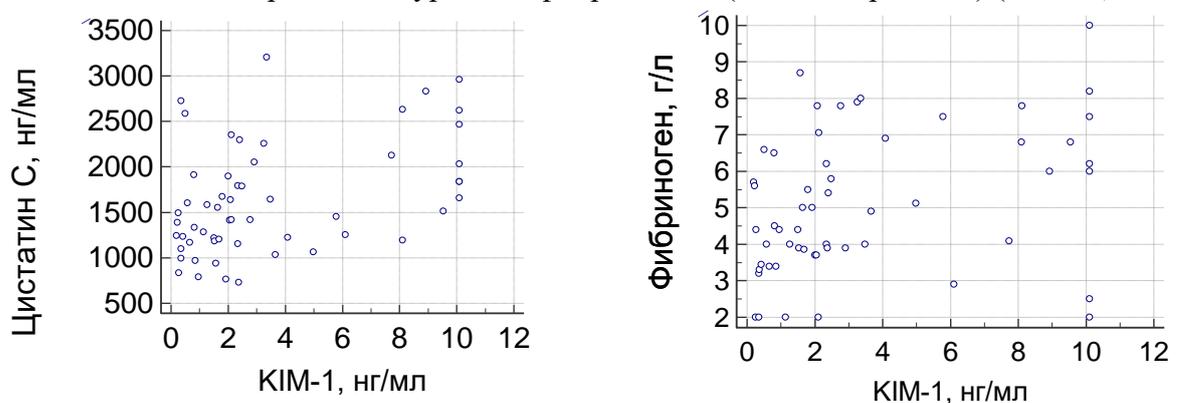


Установлена сильная прямая корреляция между мочевым уровнем КИМ-1 и величиной СПУ ( $R_s=0,62$ ;  $p=0,001$ ) и сильная обратная корреляция между уровнем в моче КИМ-1 и уровнем в сыворотке альбумина ( $R_s= -0,54$ ;  $p=0,001$ ) (рис. 9); в то же время, не выявлено корреляции между КИМ-1 и уровнем ГУ ( $R_s= 0,20$ ;  $p=0,11$ ).



**Рисунок 9.** Уровень молекулы повреждения КИМ-1 в моче больных ХГН (группы I-IV) в зависимости от показателя суточной ПУ и показателя альбумина сыворотки.

Была установлена сильная корреляция между исследуемым показателем и концентрацией цистатина С ( $R_s= 0,42$ ;  $p=0,001$ ) при том, что корреляции с сывороточным креатинином отмечено не было. Выявлена значимая корреляция между концентрацией КИМ-1 в моче и сывороточным уровнем фибриногена ( $R_s= 0,40$ ;  $p=0,002$ ) (Рис. 10).

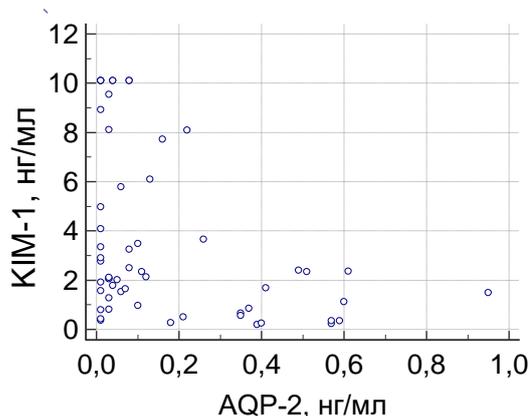


**Рисунок 10.** Уровень молекулы повреждения КИМ-1 в моче больных ХГН (группы I-IV) в зависимости от показателя цистатина С сыворотки и сывороточной концентрации фибриногена.

Корреляций между уровнем молекулы повреждения КИМ-1 в моче и показателями натриевого обмена (концентрацией натрия в сыворотке и разовых порций мочи) выявлено не было.

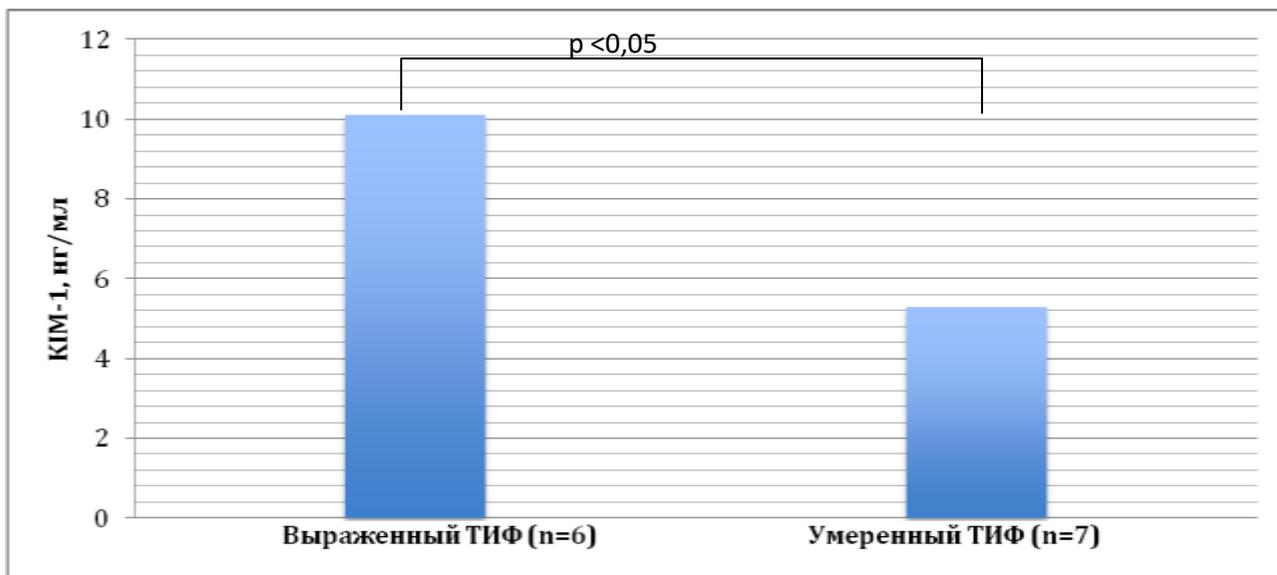
Отсутствовала корреляция между мочевым уровнем КИМ-1 и сывороточным уровнем копептина ( $R_s = 0,25$ ;  $p = 0,86$ ).

Выявлена достоверная обратная корреляция между мочевым уровнем КИМ-1 и уровнем АКП-2 в моче ( $R_s = -0,38$ ;  $p = 0,004$ ) (Рис. 11).



**Рисунок 11.** Уровень АКП-2 в моче больных ХГН (группы I-IV) в зависимости от уровня в моче КИМ-1.

С учетом указаний на связь экспрессии молекулы повреждения КИМ-1 с процессами фиброзного ремоделирования тубулоинтерстиция нами проведено исследование соотношения выраженности фиброзных изменений в нефробиоптате с величиной мочевой экскреции КИМ-1. По результатам полуколичественной оценки выраженности ТИФ в нефробиоптатах 13 пациентов с НС отмечена прямая зависимость уровня мочевой экскреции КИМ-1 от степени морфологических изменений в почечном тубулоинтерстиции, а именно: у больных, в биоптате почки которых выявлен выраженный ТИФ, уровень экскреции с мочой КИМ-1 был значительно выше, чем у больных с умеренным ТИФ в нефробиоптате ( $p < 0,05$ ) (Рис. 12).

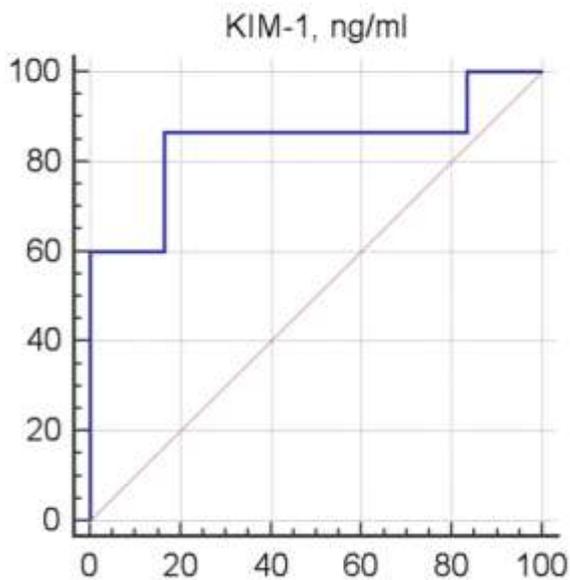


*Рисунок 12. Зависимость мочевой экскреции молекулы повреждения КИМ-1 от выраженности ТИФ в биоптатах почки пациентов с НС (n-13).*

#### **4. Прогностическое значение определения экскреции с мочой молекулы повреждения КИМ-1 у больных протеинурическими формами ХГН.**

На основании результатов корреляционного анализа, свидетельствующих о связи уровня экскреции КИМ-1 у больных ХГН с выраженностью белковой дискразии сыворотки крови и уровнем суточной ПУ, нами оценено значение определения этого мочевого биомаркера как фактора риска персистирования/рефрактерности НС. Среди 47 больных ХГН были отобраны 23 больных активными протеинурическими формами ХГН, получавших примерно одинаковую стандартную медикаментозную терапию, у которых можно было проследить динамику ПУ в последующие 1-1,5 года. У больных с сохранением первоначально высокой ПУ - подгруппа А (n=15), которая нами была обозначена условно как «с ухудшением», исходный уровень экскреции КИМ-1 был в среднем в 2,5 раза выше, чем у больных подгруппы Б (n=7) «с улучшением» - уменьшением величины суточной ПУ более чем на 50% от первоначальной и нормализацией белковых фракций крови.

На основании этих результатов построена ROC-кривая с целью количественной оценки значения уровня экскреции КИМ-1 как показателя прогноза ХГН по критерию персистирования/рефрактерности НС. Площадь под кривой (AUC) составила 0,844. Согласно ROC-кривой значения КИМ-1 больше 2,34 нг/мл с чувствительностью 86,67% и специфичностью 83,33% позволяют предсказать стойкий характер высокой ПУ у больных активными протеинурическими формами ХГН. (рис. 13)



**Рисунок 13. ROC–кривая оценки прогностического значения мочевого показателя молекулы повреждения KIM-1.**

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что для больных протеинурическими формами ХГН, у которых показателем сохраняющейся активности является персистирующий/рефрактерный НС, отличительным признаком является высокая экскреция с мочой KIM-1.

### **Заключение**

У больных активным ХГН при выраженной ПУ/НС и ТИФ нами выявлены нарушения внутрипочечных эффекторных механизмов регуляции опосредуемого АДГ водно-натриевого обмена, о чем свидетельствует независимое от степени повышения сывороточного уровня копептина снижение экскреции с мочой биомаркера АКП-2. Эти нарушения у больных с НС могут вести к конкурентному усилению альтернативных путей реабсорбции воды в дистальном отделе нефрона, предположительно через дополнительную активацию эпителиальных натриевых каналов (ENaC).

С другой стороны, эпителиально-клеточная канальцевая дисфункция при ХГН может проявляться, наряду с нарушением регуляции почечной проницаемости для воды, также и аутокринно/паракринным влиянием на процессы фиброзного ремоделирования тубулоинтерстиция через выработку иммунологически активной молекулы повреждения KIM-1 с ее способностью, подобно хемоаттрактантному белку MCP-1, активировать макрофаги и миофибробласты. А именно с выраженностью ТИФ, как было убедительно показано в экспериментальных и клинических исследованиях (Козловская Л.В., Бобкова И.Н., 2003), включая и проведенное нами, прямо коррелирует степень почечной недостаточности при активных протеинурических формах ХГН.

Многофункциональность изученных биомаркеров обосновывает их применение в реальной клинической практике в качестве критериев активности/прогрессирования протеинурических форм ХГН, что подтверждено нами при корреляционном анализе и построении ROC-кривой оценки прогностического значения мочевого показателя КИМ-1.

### Выводы

1. У больных с протеинурическими формами ХГН в отличие от больных с ведущим синдромом ГУ отмечается повышение в сыворотке крови уровня суррогатного маркера АДГ копептина ( $p < 0,05$ ), достоверно более выраженное у больных с НС, особенно в сочетании с преходящей ПН, чем у больных с частичной ремиссией НС ( $p < 0,05$ ); установлена сильная корреляция сывороточного уровня копептина с величиной суточной ПУ – прямая ( $R_s = 0,46$ ,  $p = 0,00017$ ), и с сывороточным уровнем альбумина – обратная ( $R_s = -0,51$ ,  $p = 0,0003$ ), при отсутствии корреляции с концентрацией натрия в сыворотке крови и разовых порциях мочи.
2. У больных ХГН с НС, в том числе и при развитии частичной ремиссии, несмотря на высокий сывороточный уровень копептина выявляется достоверно более низкий уровень экскреции с мочой АКП-2 по сравнению с больными, у которых ведущим симптомом является ГУ ( $p < 0,001$ ), и особенно контролем ( $p < 0,0001$ ), что указывает на угнетение АДГ-зависимых внутрипочечных эффекторных механизмов при НС; об этом свидетельствует также обратная корреляция величины мочевого экскреции АКП-2 с ПУ ( $R_s = -0,43$ ,  $p = 0,001$ ), и прямая корреляция с сывороточным уровнем альбумина ( $R_s = 0,41$ ,  $p = 0,005$ ).
3. У всех больных протеинурическими формами ХГН, по сравнению с больными ХГН с ведущим симптомом ГУ и контролем, наблюдается статистически значимое повышение экскреции с мочой молекулы повреждения КИМ-1, особенно выраженное среди больных активным ХГН при сочетании НС и почечной дисфункции; отмечается сильная прямая корреляция величины мочевого экскреции КИМ-1 с суточной ПУ ( $R_s = 0,62$ ,  $p = 0,001$ ), сывороточным уровнем цистатина С ( $R_s = 0,42$ ,  $p = 0,01$ ) и фибриногена ( $R_s = 0,40$ ,  $p = 0,02$ ), и обратная - с сывороточным уровнем альбумина ( $R_s = -0,54$ ,  $p = 0,001$ ).
4. При анализе взаимосвязи изученных биомаркеров у больных активными протеинурическими формами ХГН, особенно с наличием почечной дисфункции, обнаруживается достоверная корреляция высокого уровня экскреции КИМ-1 с низким уровнем экскреции АКП-2 ( $R_s = -0,38$ ,  $p = 0,04$ ) и связь с выраженностью ТИФ в нефробиоптате, что может свидетельствовать о роли гиперпродукции КИМ-1 в почке как важной составляющей процессов фиброзного ремоделирования интерстиция, и нарушения АДГ-зависимого эффекторного звена ретенции воды при НС.

5. Наличие достоверной сильной корреляции клинико-лабораторных показателей выраженности НС с величиной экскреции КИМ-1 (прямой) и АКП-2 (обратной) у больных активными протеинурическими формами ХГН обосновывает использование этих мочевых биомаркеров для неинвазивной оценки прогноза течения ХГН: на основании построения ROC-кривой уровень экскреции с мочой КИМ-1 2,34 нг/мл (площадь под кривой 0,83) позволяет предсказать с чувствительностью 86,7% и специфичностью 83,3% прогрессирующее течение протеинурических форм ХГН.

### Практические рекомендации

- У больных протеинурическими формами ХГН исследование сывороточного уровня копептина, уровня экскреции с мочой АКП-2 и молекулы повреждения КИМ-1 имеет практическое значение как тесты оценки нарушения эффекторного звена АДГ-зависимой регуляции водно-натриевого обмена и степени фиброзного ремоделирования почечного тубулоинтерстиция, прямо коррелирующей с нарастанием почечной недостаточности.
- У больных с клинически активными протеинурическими формами ХГН значение КИМ-1 в моче 2,34 нг/мл и выше позволяет предсказать персистирование высокой рефрактерной ПУ (НС), требующей своевременной коррекции патогенетической терапии.

Выявление высокого уровня экскреции с мочой КИМ-1 в сочетании с низким уровнем АКП-2 свидетельствует о неблагоприятном прогнозе течения ХГН. Неинвазивность этих тестов открывает более широкие возможности для их использования в практической деятельности.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Пулин А.А., Бровко М.Ю., Кустова Т.Ю., Козловская Л.В., Фомин В.В., Мухин Н.А. Клиническое значение биомаркеров водно-натриевого обмена, выявляемых в сыворотке крови и моче у пациентов с протеинурическими формами хронического гломерулонефрита. **Терапевтический архив. 2014. Т. 86. №6. С. 24-29.**
2. Пулин А.А., Кустова Т.Ю., Бровко М.Ю., Козловская Л.В., Фомин В.В. 1, Мухин Н.А. Клиническая оценка циркулирующего (pro-ANP) и локально-почечного (сGMP) натрийуретических пептидов при протеинурических формах хронических гломерулонефритов. **Клиническая нефрология. 2014. №4. С. 89-94.**

**Список сокращений**

АД	артериальное давление
АГ	артериальная гипертензия
АДГ	антидиуретический гормон
АКП-2	аквапорин второго типа
ГУ	гематурия
ДАД	диастолическое артериальное давление
МГН	мембранозный гломерулонефрит
МИГН	гломерулонефрит с минимальными изменениями
МКГН	мезангиокапиллярный гломерулонефрит
МПГН	мезангиопролиферативный гломерулонефрит
НС	нефротический синдром
ПН	почечная недостаточность
ПУ	протеинурия
САД	систолическое артериальное давление
СКФ	скорость клубочковой фильтрации
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
ТИФ	тубулоинтерстициальный фиброз
ФСГС	фокально-сегментарный гломерулосклероз
ХБП	хроническая болезнь почек
ХГН	хронический гломерулонефрит
ХСН	хроническая сердечная недостаточность
КИМ-1	kidney injury molecule 1
МСР-1	monocyte chemotactic protein 1

**АННОТАЦИЯ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ****Бровко Михаила Юрьевича (Российская Федерация)****Клиническое значение сывороточных и мочевых биомаркеров нарушений водно-натриевого обмена при протеинурических формах ХГН.**

В исследование включено 47 пациентов с ХГН. У больных протеинурическими формами ХГН в отличие от больных ХГН с гематурией и здоровых лиц выявляется повышение в сыворотке крови суррогатного маркера АДГ - копептина, и снижение экскреции с мочой белка водного канала – АКП-2. Наиболее высокий сывороточный уровень копептина и низкий уровень экскреции АКП-2 с мочой наблюдается у больных клинически активным нефритом с нефротическим синдромом, особенно с почечной дисфункцией, свидетельствуя о значении нарушений в системе АДГ/АКП-2 как маркеров тяжести повреждения почек при ХГН. У больных протеинурическими формами ХГН отмечается повышение экскреции с мочой молекулы повреждения КИМ-1, уровень которой прямо коррелирует со степенью клинической активности ХГН – величиной протеинурии (особенно при сочетании с почечной дисфункцией) и обратно коррелирует с уровнем экскреции с мочой АКП-2. Это может указывать на роль КИМ-1 в дисрегуляции водно-натриевого обмена через участие в процессах формирования ТИФ. Уровень мочевой экскреции молекулы повреждения КИМ-1 выше 2,34 нг/мл у больных ХГН с НС с чувствительностью 86,7% и специфичностью 83,3 % позволяет предсказать дальнейшую персистенцию и рефрактерность к терапии НС, обосновывая возможность практического использования этого неинвазивного теста для оценки прогноза течения ХГН.

**SUMMARY****Brovko Mikhail Yurievich (Russian Federation)****The clinical significance of serum and urine biomarkers of water-sodium dysmetabolism in proteinuric forms of chronic glomerulonephritis (CGN).**

The study included 47 patients with CGN. Patients with proteinuric forms of CGN, unlike CGN patients with hematuria and healthy individuals, had the elevated serum level of copeptin (surrogate marker of ADH), while the urinary excretion of water channel protein - AQP-2 decreased. Patients with active nephritis with nephrotic syndrome, especially with renal dysfunction had the highest serum copeptin concentration and the extremely low AQP-2 urine excretion, indicating the value of the ADH/AQP-2 system dysregulation as a marker of kidney injury in CGN. In patients with proteinuric forms of CGN marked increase of urinary excretion of KIM-1 is shown, and its level directly correlates with proteinuria, as the marker of clinical activity of CGN (especially with renal dysfunction) and inversely correlates with the level of urinary excretion of AQP-2. This may indicate the role of KIM-1 in the dysregulation of water and sodium metabolism by participating in the formation of TIF. The level of urinary excretion of KIM-1 above 2.34 ng/ml in CGN patients predicts further persistence and refractory to therapy (with a sensitivity of 86.7% and a specificity of 83.3%), indicating the possibility of the practical use of this non-invasive test to assess the prognosis of CGN.