

ЧЖЭН АНЬТАЙ

**Прогностическое значение тканевых и мочевых биомаркёров
гипоксии и нарушения локально-почечного ангиогенеза
при хронической болезни почек**

14.01.04 – внутренние болезни

14.01.29 – нефрология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена на кафедре внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой внутренних,
профессиональных болезней и пульмонологии
медико-профилактического факультета
ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова
Минздрава России и кафедрой внутренних болезней
факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова

Николай Алексеевич Мухин

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор кафедры нефрологии
факультета дополнительного профессионального
образования ГБОУ ВПО «Московский
государственный медико-стоматологический
университет имени А.И. Евдокимова»
Минздрава России

Галина Владимировна Волгина

Доктор медицинских наук, профессор
кафедры трансплантации, нефрологии
и искусственных органов
факультета усовершенствования врачей
ГБУЗ Московской области «Московский областной
научно-исследовательский клинический институт
имени М.Ф. Владимирского»

Елена Ивановна Прокопенко

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «30» июня 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; Городская клиническая больница № 64).

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,
доктор медицинских наук, профессор

Г.К. Киякбаев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одной из актуальных задач нефрологии и внутренней медицины в целом является совершенствование методов нефропротективной стратегии, направленной на торможение прогрессирования хронической болезни почек (ХБП) и снижения сопряженного с ней сердечно-сосудистого риска (Causer, 2010, Н.А. Мухин, Е.М. Шилов, А.В. Смирнов, 2012). Для ее осуществления ключевое значение имеет изучение гемодинамических механизмов прогрессирования ХБП – не только при сосудистых повреждениях почек, включая все типы кардиоренального синдрома (С. Ропсо и соавт., 2009, В.С. Моисеев, Н.А. Мухин и соавт., 2014), но и при иммуновоспалительных заболеваниях почек, в частности при хроническом гломерулонефрите (ХГН). Именно на экспериментальной модели ХГН эти механизмы начали и продолжают интенсивно изучаться по мере накопления научных данных и совершенствования методических подходов.

Разработанная в конце 80 – начале 90 гг. прошлого столетия В. Brenner'ом и Т. Hostetter'ом теория гиперперфузии и гиперфльтрации остаточных клубочков в условиях олигонефронии (критического уменьшения числа функционирующих нефронов), опиралась на гемодинамические пути развития гломерулосклероза, но не объясняла прогрессирование тубулоинтерстициального фиброза (ТИФ), тяжесть которого более тесно коррелирует с прогнозом ХБП, чем патология клубочков (А. Bohle и соавт., 1996, К. Такаоги и соавт., 2015). Важной вехой в понимании механизмов формирования ТИФ имела концепция ведущей роли в повреждении почечного тубулоинтерстиция хронической гипоксии (L.G. Fine и соавт., 1993), среди причин которой при ХБП обсуждают различные функциональные нарушения и структурные изменения почечных сосудов. Пусковым звеном в этом процессе считают сужение выносящей артериолы в ответ на гиперактивацию почечной ренин-ангиотензиновой системы (РАС) и облитерацию перитубулярного капиллярного русла, выраженность которых может меняться на разных стадиях заболевания (М. Nangaku, 2006, N.K. Hollenberg, 2007, М.Ю. Швецов и соавт., 2010, G. Mayer , 2011).

На сегодняшний день число клинических исследований, посвященных роли хронической гипоксии в прогрессировании ХБП, невелико, что связано с трудностью оценки выраженности ишемии почечной ткани в клинических условиях (S.N. Neuman и соавт., 2008.). Доступные инструментальные методы исследования позволяют выявлять преимущественно нарушения почечного кровотока в сосудах крупного и среднего калибра, и недостаточно информативны в оценке выраженности нарушений почечной микроциркуляции. Результаты имеющихся единичных работ этого направления неоднозначны (L.J. Petersen и соавт., 1997, С.А. Мартынов и соавт., 2003, J. Neugarten, 2012). Поэтому поиск чувствительных и специфичных биомаркеров хронического гипоксического повреждения почек имеет важное научное и

практическое значение, поскольку позволяет оптимизировать методы нефропротекции при целом ряде сопряженных с ХБП состояний, в том числе кардиоваскулярных заболеваниях.

В качестве таких биомаркёров, кроме уже достаточно широко используемого в оценке острого повреждения почек липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin - NGAL), могут рассматриваться фактор, индуцируемый гипоксией, 1 типа (Hypoxia Inducible Factor – HIF-1) и другой биомаркер гипоксии – карбоангидраза-9 (CA-9), находящиеся под контролем HIF факторы регуляции ангиогенеза – сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF), тромбоспондин 1 типа (THBS1), ангиопоэтин 2 типа (ANGPT2), ангиотензиноген (ANG), играющие важную роль в ремоделировании тубулоинтерстиция и в сопряженных с ним процессах облитерации перитубулярного капиллярного русла с развитием хронической гипоксии и в конечном итоге - с прогрессирующим нарастанием ТИФ (D.H. Kang и соавт., 2001, L. Gunaratnam и J.V. Bonventre, 2009, М.Ю. Швецов и соавт., 2010, D. Long и соавт., 2012, A.R. Chade, 2013.).

Цель исследования

Оценить значение определения уровня экспрессии в почечной ткани и экскреции с мочой биомаркеров гипоксии (HIF-1 α , карбоангидраза-9) и факторов регуляции ангиогенеза (VEGF, тромбоспондина-1, ангиопоэтина-2) в оценке активности/тяжести поражения почек у больных хроническим гломерулонефритом (ХГН), как одной из наиболее клинически и прогностически значимых форм ХБП для оптимизации методов нефрокардиопротективной терапии.

Задачи исследования:

У больных с различными клиническими вариантами течения ХГН (в зависимости от выраженности протеинурии и наличия нефротического синдрома, степени снижения функции почек, наличия и тяжести артериальной гипертензии):

1. Изучить величину экспрессии в ткани биоптата почки и уровень экскреции с мочой VEGF, THBS1, ANGPT2 как биомаркеров, отражающих нарушение ангиогенеза в почечном тубулоинтерстиции.
2. Определить по данным морфометрии нефробиоптата плотность перитубулярного капиллярного русла, в сопоставлении с морфологическими критериями нарушения перфузии почечных клубочков (гломеруломегалия и ишемия), связь этих сосудистых изменений с уровнем экспрессии регуляторов ангиогенеза – VEGF, THBS1 и выраженностью нефросклероза.
3. Исследовать в ткани биоптата почки тубулярную экспрессию активной альфа-субъединицы HIF-1 α и экскрецию с мочой карбоангидраза-9 как биомаркеров гипоксии в сопоставлении с показателями тубулярного повреждения –

экспрессией в ткани почки PAX-2, уровнем экскреции с мочой NGAL и коллагена 4 типа (COL4).

4. Установить эффективность изученных биомаркеров гипоксического ремоделирования почечного тубулоинтерстиция в оценке активности/тяжести течения и прогноза ХБП.

Научная новизна

Впервые в отечественной медицинской практике на большом клиническом материале (172 больных одной из наиболее распространенных и клинически значимых форм ХБП – ХГН), с использованием большого спектра биомаркеров (VEGF, THBS1, ANGPT2, HIF-1 α , CA-9, ANG, NGAL, PAX-2, COL4) изучено значение механизмов локально-почечного ангиогенеза и гипоксического повреждения в формировании тубулоинтерстициального фиброза (ТИФ) как морфологической основы развития хронической почечной недостаточности.

Состояние системы ангиогенеза почек оценено в нефробиоптатах больных ХГН в сопоставлении со структурными и иммунохимическими изменениями на разных уровнях почечного сосудистого русла (прегломерулярного, гломерулярного, перитубулярного) и выраженностью гипоксии/ишемии соответствующих отделов нефрона. На этом основании выдвинута концепция ключевого значения сочетанного гипоксического и протеинурического тубулоинтерстициального ремоделирования с формированием ТИФ для прогрессирования ХБП в контексте кардиоренальных взаимодействий.

При использовании иммуногистохимического изучения биоптатов почки и определения экскреции биомаркеров с мочой больных ХГН показано, что нарушения ангиогенеза и выраженность гипоксии в тубулоинтерстиции почки коррелируют с клиническими признаками активности/тяжести течения ХГН и могут быть использованы как критерий прогноза.

Практическая значимость

Результаты настоящего исследования подтверждают роль нарушений ангиогенеза и механизма гипоксического ремоделирования тубулоинтерстиция почек в прогрессировании ХБП на основе определения тканевых и мочевых биомаркеров, отражающих выраженность этих нарушений.

Оценка указанных биомаркеров, особенно благодаря возможности неинвазивного подхода – исследования мочи, позволяет прогнозировать у больных ХБП риск прогрессирования тубулоинтерстициального фиброза (ТИФ), прямо коррелирующего со степенью снижения функции почек. Выявление повышенной экскреции с мочой биомаркеров гипоксии и нарушения локально-почечного ангиогенеза целесообразно учитывать при обосновании активной иммуносупрессивной терапии у больных ХГН и нефрокардиопротективной терапии при ХБП в целом; полученные результаты могут быть положены в основу разработки новых диагностических систем для мониторинга прогрессирования ХБП, и создают

предпосылки для оптимизации методов таргетной терапии с антигипоксическим и вазопротективным эффектом для улучшения прогноза ХБП.

Положения, выносимые на защиту

1. У больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) как одной из наиболее клинически значимых форм ХБП в зависимости от степени активности/тяжести – уровня протеинурии, наличия нефротического синдрома и выраженности почечной недостаточности, отмечаются структурно-функциональные нарушения локально-почечной системы ангиогенеза, ведущие к гипоксическому ремоделированию тубулоинтерстиция почки с формированием тубулоинтерстициального фиброза (ТИФ) как важного механизма прогрессирования ХБП.
2. О роли гипоксии в хроническом повреждении почек при ХГН, обуславливающим формирование ТИФ, свидетельствует повышенное накопление в цитоплазме тубулоцитов активной α -субъединицы HIF-1 и высокая экскреция с мочой карбоангидразы-9, сочетающиеся с высоким уровнем экспрессии в ткани почки PAX2 и активной экскрецией с мочой NGAL, COL4, отражающих повреждение канальцевого эпителия у больных с прогностическими неблагоприятными формами ХГН.
3. На нарастание сопряженного с гипоксией ТИФ и в целом нефросклероза, обуславливающих ремоделирование сосудистого русла почек, указывает постепенное нарастание степени склероза почечных артериол и снижение плотности перитубулярного капиллярного русла с уменьшением синтеза стимулятора ангиогенеза VEGF и повышением продукции антиангиогенного фактора THBS1 на поздних стадиях прогрессирования ХБП.
4. Выявление ассоциации биомаркеров, характеризующих процессы гипоксического ремоделирования почечного тубулоинтерстиция – величины тканевой экспрессии HIF-1, VEGF в тубулоцатах, THBS1 в клетках интерстиция почки и уровня экскреции с мочой CA-9, VEGF, THBS1, ANGPT2, с прогностически неблагоприятными формами гломерулонефрита подтверждает их значение в прогнозировании неблагоприятного течения ХБП с исходом в терминальную почечную недостаточность.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на совместном заседании кафедры внутренних болезней факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии медико-профилактического факультета, кафедры нефрологии и гемодиализа института профессионального образования и НИО нефрологии НИЦ ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Материалы диссертации доложены на XLVII European Renal Association European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA) Congress, 27 июня 2010 г., Мюнхен, Германия; VII съезде Научного общества нефрологов России 21 октября 2010 г., Москва; XLVIII European Renal Association European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA) Congress, 25 июня 2011 г., Прага, Чехия; 14th European Congress of Internal Medicine, 15 октября 2015 г., Москва; VIII съезде Научного общества нефрологов России, 12 ноября 2015 г., Москва; и приняты к устному докладу на LIII European Renal Association European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA) Congress, 23 мая 2016 г., Вена, Австрия. В опубликованных работах полученные автором результаты изложены полно и всесторонне обсуждены.

Личный вклад автора

Автор активно участвовал во всех этапах подготовки и выполнения исследования: изучение соответствующей литературы, составление плана диссертации. Автором была разработана необходимая документация для сбора и учёта информации об обследуемых пациентах, составлена база данных. Обследование проспективной группы больных проводилось при непосредственном участии автора. Под руководством патологоанатомов Чжэн Аньтай проводилось морфологическое исследование биоптатов почки. Иммуноферментный анализ образцов мочи при непосредственном участии автора. Все публикации по теме диссертационной работы подготовлены при участии автора.

Внедрение в практику

Результаты используются в практической работе Клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева Университетской клинической больницы №3 Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, в учебном процессе на кафедре внутренних болезней факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, на кафедре внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии медико-профилактического факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова, на кафедре нефрологии и гемодиализа ИПО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 2 работы в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, одна статья принята в печать в журнал, рекомендованный ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственного исследования и их обсуждения, выводов и практических

рекомендаций. Список литературы содержит 190 источников (22 – отечественные и 168 – зарубежные). Работа иллюстрирована 11 таблицами и 19 рисунками.

База проведения

Клиническое исследование проводилось на базе клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева УКБ №3 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (директор клиники – академик РАН, д.м.н., профессор Н.А. Мухин).

Морфологическое исследование прижизненных биоптатов почки с определением морфологического варианта ХГН выполнялось проф. В.А. Варшавским на кафедре патологической анатомии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (зав. – проф., д.м.н. Е.А. Коган). Морфометрическое исследование и иммуногистохимическое исследование биоптатов почки выполнено проф., д.м.н. А.А. Ивановым и к.б.н. О.П. Поповой в Отделе клеточной и молекулярной патологии НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (директор – проф., д.б.н. А.А. Замятнин).

Иммуноферментный анализ проб мочи больных ХГН выполнен на базе НИО Нефрологии НИЦ Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (зав. – д.м.н. И.Н. Бобкова), и Межклинической иммунологической лаборатории Клинического центра Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (зав. – А.Г. Серова).

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю акад. РАН проф., д.м.н. Н.А. Мухину, а также к.м.н. М.Ю. Швецову, проф., д.м.н. Л.В. Козловской, зав. отделом клеточной и молекулярной патологии НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ имени И.М. Сеченова проф., д.м.н. А.А. Иванову и в.н.с. данного отдела, к.б.н. О.П. Поповой, профессору кафедры патологической анатомии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова, д.м.н. В.А. Варшавскому, зав. Межклинической иммунологической лабораторией Клинического центра Первого МГМУ имени И.М. Сеченова А.Г. Серовой, зав. НИО Нефрологии НИЦ Первого МГМУ имени И.М. Сеченова д.м.н. И.Н. Бобковой и всем сотрудникам отдела; доц., к.м.н. Т.Н. Красновой и всему коллективу кафедры внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. кафедрой нефрологии и гемодиализа ИПО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова проф., д.м.н. Е.М. Шилову, главному врачу клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева Университетской клинической больницы №3 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Заслуженному врачу РФ, к.м.н. В.В. Панасюку и всему коллективу сотрудников клиники.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структура исследования

Исследование проводили в 2 этапа.

1 этап: Изучение прижизненных биоптатов почки с проведением морфометрического и иммуногистохимического исследования от 90 больных ХГН, проходивших обследование и лечение в отделении нефрологии Клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева Университетской клинической больницы №3 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова в 2008-2011 гг.

2 этап: на основании результатов, полученных в ходе 1 этапа исследования, было спланировано и проведено иммуноферментное исследование мочи 82 больных ХГН, госпитализированных в клинику имени Е.М. Тареева в 2012-2014 гг.

Критерии не включения в 1 и 2 этапы исследования: возраст моложе 18 и старше 70 лет, наличие острого почечного повреждения, обострения инфекции мочевых путей на момент обследования, сахарный диабет, системные заболевания соединительной ткани, системные васкулиты, гемолитико-уремический синдром, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, злокачественные новообразования, проведение заместительной почечной терапии.

Общеклиническое исследование

Клиническое обследование проводили по традиционному для нефрологического стационара плану, включавшему изучение анамнеза жизни и заболевания почек, измерение АД, расчет индекса массы тела, исследование суточной протеинурии (ПУ), мочевого осадка (в пробе Нечипоренко), биохимический анализ сыворотки крови (креатинин, мочевиная кислота, холестерин, триглицериды), общий анализ крови. Функцию почек оценивали по скорости клубочковой фильтрации (СКФ), рассчитанной по формуле СКД-ЕРІ 2009, в модификации 2011 гг.

Специальные методы исследования

Морфометрическое исследование прижизненных биоптатов ткани почек больных разными клиническими и морфологическими вариантами ХГН включало:

А) Полуколичественную оценку состояния почечных сосудов (некротизирующие васкулиты, пролиферация интимы/медии, гиалиноз и склероз артериол) – каждый показатель оценивали по шкале 0-3 балла.

Б) Полуколичественную оценку нарушений геометрии почечных клубочков, отражающих состояние их кровотока (гломеруломегалия, гломерулосклероз с солидификацией петель, наличие ишемизированных клубочков) – каждый показатель оценивали по шкале 0-3 балла.

В) Расчет полуколичественных морфологических индексов активности и склероза по методике Н. Austin в модификации А.А. Иванова.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) серийных парафиновых срезов проводили двухшаговым иммунопероксидазным методом с использованием моноклональных и поликлональных первичных антител (АТ) (**Таблица 1**).

Таблица 1**Биомаркеры, изученные методом ИГХ в ткани почки больных ХГН**

Биомаркер	Функция	Характеристика АТ	n
HIF-1 α	Маркер гипоксии	Моноклональные мышинные АТ, Lab Vision / NeoMarkers	69
VEGF	Активатор ангиогенеза	Моноклональные мышинные АТ, Santa Cruz Biotechnology	69
THBS1	Ингибитор ангиогенеза и активатор фиброгенеза	Моноклональные мышинные АТ, Novocastra	69
CD34	Специфический поверхностный маркер эндотелиальных клеток	Моноклональные мышинные АТ, Dako	63
ATG	Компонент ренин-ангиотензиновой системы	Поликлональные козы АТ, RnD	57
PAX-2	Маркер повреждения и фиброгенеза в почке	Поликлональные кроличьи АТ, Abcam	69

При интерпретации результатов учитывали интенсивность окрашивания изучаемых факторов (от 0 до 6 баллов) и локализацию в гломерулярной и тубулоинтерстициальной областях.

Иммуноферментное исследование концентрации в моче больных ХГН биомаркеров состояния ангиогенеза, которые были оценены на первом этапе работы в ткани биоптата почки – VEGF-A и THBS1, а также ингибитора и модулятора ангиогенеза ANGPT2, маркера гипоксии CA-9, маркера повреждения канальцевого эпителия NGAL и маркера фиброгенеза в почках COL4 (**Таблица 2**).

Таблица 2**Биомаркеры, исследованные методом ELISA, в моче больных ХГН**

Биомаркер	Функция	Производитель реагента	n
CA-9	Маркер гипоксии	RnD Systems	74
VEGF-A	Активатор ангиогенеза	eBioscience (Bender MedSystems)	80
THBS1	Ингибитор ангиогенеза и активатор фиброгенеза	RnD Systems	80
ANGPT2	Активатор неоангиогенеза	RnD Systems	80
NGAL	Маркер почечного повреждения	BioVendor	80
COL4	Маркер повреждения и фиброгенеза в почке	Bender Medsystems	82

10 мл утренней мочи собирали в сухие пластиковые пробирки центрифугировали при комнатной температуре 15 минут с частотой 3000 оборотов в

минуту для удаления клеточного и кристаллического осадка. Супернатант замораживали и хранили при температуре - 80° С, исследовали методом ELISA.

Характеристика обследованных больных

Клинические данные больных, обследованных на 1 и 2 этапах исследования, представлены в таблице (Таблица 3).

Таблица 3

Клиническая характеристика больных ХГН, обследованных на 1 и на 2 этапах работы

Показатели	Этапы исследования	1 этап, 90 больных	2 этап, 82 больных
Возраст, лет		34,2 (31,5; 37,0)	36,5 (28,0; 55,0)
Длительность ХБП, лет		4,1 (3,0; 5,2)	9,6 (7,0; 12,2)
Пол: мужской / женский		62,2% / 37,8%	45,0% / 55,0%
ИМТ, кг/м ²		24,8 (23,8; 25,8)	26,2 (25,1; 27,2)
АД сист., мм рт.ст.		137 (133; 141)	130 (126; 134)
АД диаст., мм рт.ст.		87 (84; 90)	82 (80; 85)
Число получаемых препаратов для снижения АД		0,87 (0,64; 1,10)	1,37 (1,20; 1,63)
Гематурия более 10 эритроцитов в п/з, %		38,9%	26,0%
Протеинурия, г/сут:		4,70 (3,85; 5,56)	2,88 (2,12; 3,64)
Частота протеинурии разной степени			
<0,5 г/сут		5,8%	26,8%
0,5-3,4 г/сут		28,7%	43,9%
≥3,5 г/сут		65,5%	29,3%
Нефротический синдром		52,2%	31,7%
Стадия ХБП			
1-2 (СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73м ²)		65,5%	68,3%
3а (СКФ 45-59 мл/мин/1,73м ²)		13,3%	15,9%
3б (СКФ 30-44 мл/мин/1,73м ²)		10,0%	8,5%
4-5 (СКФ < 30 мл/мин/1,73м ²)		11,0%	7,3%
Анемия (уровень гемоглобина крови ниже 130 г/л для мужчин и ниже 120 г/л для женщин)		30%	24,7%
Морфологический вариант ХГН			
мезангиопролиферативный нефрит (МПГН)		39,9%	23,5%
мезангиокапиллярный нефрит (МКГН)		10,0%	17,7%
нефрит с минимальными изменениями (МИ)		4,4%	14,7%
фокальный сегмент. гломерулосклероз (ФСГС)		12,1%	8,8%
мембранозная нефропатия (МН)		21,1%	23,5%
фибропластический гломерулонефрит (ФГН)		12,2%	11,8%
Иммуносупрессивная терапия на момент обследования		50%	53,7%
Лечение препаратами, подавляющими РАС, на момент обследования		42%	65,9%

Количественные показатели представлены в виде среднего значения и 95% доверительных интервалов; качественные – в процентах от числа обследованных на данном этапе работы.

Учитывая, что массивная ($> 3,5$ г/сут) протеинурия (ПУ) и сниженная функция почек (СКФ < 60 мл/мин/1,73 м²) являются доказанными факторами риска прогрессирования ХБП, мы выделили среди больных, обследованных на 1 и 2 этапе исследования, 4 клинико-прогностические группы:

группа 1 – без массивной ПУ, без значительного снижения функции (ПУ $\leq 3,5$ г/сут, СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73 м²);

группа 2 – без массивной ПУ, со значительным снижением функции (ПУ $\leq 3,5$ г/сут, СКФ < 60 мл/мин/1,73 м²);

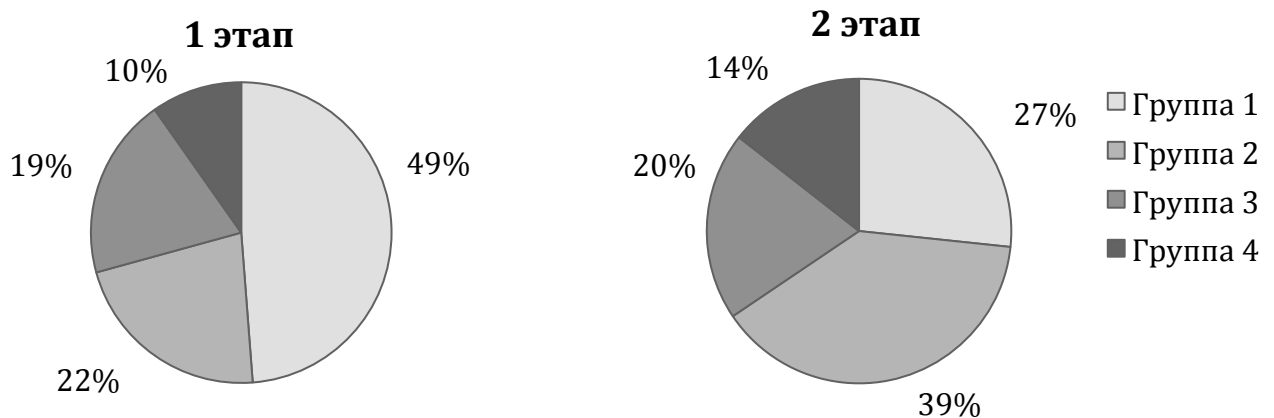
группа 3 – с массивной ПУ, без значительного снижения функции (ПУ $> 3,5$ г/сут, СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73 м²),

группа 4 – с массивной ПУ и со значительным снижением функции (ПУ $> 3,5$ г/сут, СКФ < 60 мл/мин/1,73 м²).

Среди больных, обследованных на 1 этапе работы, преобладали пациенты без массивной ПУ ($> 3,5$ г/сут) и без значительного снижения функции почек СКФ < 60 мл/мин/1,73 м² – 49% (группа 1). Среди больных, обследованных на 2 этапе работы, большую часть составили пациенты без массивной ПУ, но со снижением функции – 39% (группа 2). Доля больных, отвечающих критериям 3 и 4 групп активности, была практически одинаковой среди пациентов, обследованных на 1 и на 2 этапах исследования (Рисунок 1).

Рисунок 1

Частота клинико-прогностических групп среди больных, обследованных на 1 и 2 этапах работы



Статистический анализ

Учитывая неправильный характер распределения большинства признаков, рассчитывали медиану и 95% доверительные интервалы исследуемых показателей в группах. Достоверность различия рассчитывали с использованием методов непараметрической статистики (для независимых выборок): по методу Mann-Whitney и при помощи критерия χ^2 по Pearson. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Для выявления и оценки связей между исследуемыми показателями, применяли непараметрический корреляционный анализ по методу Spearman. О силе и направленности связи судили по величине и знаку коэффициента регрессии R_s . Достоверными считали корреляции с $p < 0,05$.

Все расчеты проводили с использованием пакетов программ STATISTICA for Windows, версия 8,0, © StatSoft, Inc., 1987-2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфометрическое изучение прегломерулярных артериол, капилляров клубочков и перитубулярных капилляров в биоптатах почки больных ХГН

Наиболее частыми изменениями прегломерулярных сосудов были артериологиперплазия (20,0%) и артериолосклероз (48,9%); в то же время пролиферация комплекса интима/медия отнеслась только в 6,7% исследованных биоптатов. То есть, преобладали изменения, обуславливающие гиперперфузию клубочков вследствие нарушения способности склерозированной сосудистой стенки осуществлять процессы ауторегуляции кровотока.

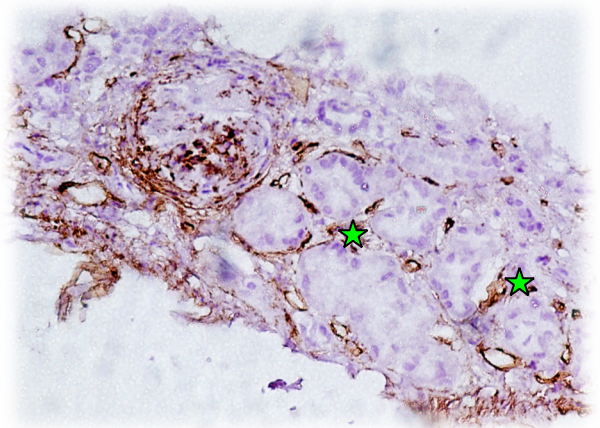
В 28,1% биоптатов отмечалась гломеруломегалия, являющаяся морфологическим эквивалентом клубочковой гиперперфузии и гипертензии; в 36,4% биоптатов – гломерулосклероз с солидификацией сосудистых петель как дальнейшая стадия гиперперфузионного поражения клубочков. В то же время морфологические признаки ишемии почечных клубочков выявлялись реже – в 21,2% биоптатов.

Эти данные согласуются с традиционными представлениями о гемодинамических механизмах прогрессирования ХБП, основанных на теории клубочковой гипертензии/гиперфильтрации (В. Brenner и Т. Hostetter, 1982).

При ИГХ с моноклональными АТ к маркеру эндотелиальных клеток CD34 установлена значительная вариабельность плотности перитубулярных капилляров в биоптатах больных ХГН от максимально 6 (из 6 возможных) до 2 баллов. Наиболее заметные признаки обеднения капиллярного русла наблюдались при выраженном ТИФ почечной ткани (Рисунок 2).

Рисунок 2

Частичная облитерация перитубулярной капиллярной сети



Иммуногистохимическая реакция к маркеру эндотелиальных клеток CD 34. Иммунопероксидазный метод на парафиновых срезах. X100

★ – частично облитерированная перитубулярная капиллярная сеть

Таблица 4

Корреляции структурных изменений почечного микрососудистого русла с клинико-морфологической характеристикой больных ХГН

	Прегломерулярные артериолы			Клубочки			Интерстиций
	пролиферация интимы/меди	гиалиноз	склероз	гломеруло-мегалия	глом.склероз с солидиф. петель	ишемизированные клубочки	плотность перитуб. капилляров
Возраст	0,08	-0,16	-0,15	0,26	-0,13	-0,05	-0,04
Длительность АГ	-0,23	-0,09	-0,14	0,04	-0,31	-0,18	0,02
Длительность ХБП	-0,05	0,02	0,07	-0,19	0,04	0,08	-0,08
ИМТ	-0,14	-0,06	-0,08	0,29	-0,08	0,00	-0,02
АД сист.	0,06	0,08	0,12	0,15	0,00	-0,15	-0,23
АД диаст.	0,10	0,10	0,15	0,27	0,15	-0,16	-0,19
Число препаратов для снижения АД	-0,09	0,01	0,05	-0,05	0,15	-0,14	0,03
Гемоглобин	-0,01	-0,06	-0,02	0,29	-0,07	0,14	0,20
Суточная ПУ	0,05	0,04	-0,01	0,17	-0,06	0,04	0,07
СКФ <small>СКД ЕРІ</small>	-0,05	-0,21	-0,32	0,11	-0,44	-0,02	0,57
Холестерин	-0,02	-0,10	-0,20	0,12	-0,32	0,09	0,16
Мочевая кислота	-0,01	0,07	0,16	0,21	0,13	0,12	-0,13
Индекс активности	0,33	0,34	0,66	-0,22	0,49	-0,18	-0,50
Индекс склероза	0,29	0,59	0,83	-0,21	0,71	-0,04	-0,66
Пролиферация интимы/меди	–	0,31	0,32	0,08	0,25	-0,09	-0,13
Гиалиноз артериол	0,31	–	0,58	-0,11	0,40	0,06	-0,45
Склероз артериол	0,32	0,58	–	-0,17	0,67	-0,02	-0,51

Полужирным шрифтом выделены корреляции с $p < 0,05$

Выявлены достоверные корреляции между выраженностью изменений прегломерулярных, гломерулярных и перитубулярных почечных микрососудов с показателями тяжести артериальной гипертензии, нарушениями обмена, а также клиничко-морфологическими признаками активности/тяжести ХГН (Таблица 4).

Из представленных данных ясно, что формирование артериолосклероза тесно связано с показателями прогрессирования ХГН – снижением СКФ и высокими морфологическими индексами активности и склероза, но не с тяжестью артериальной гипертензии. Таким образом, в отличие от эссенциальной АГ, где определяющее значение для поражения сосудов мышечного типа имеет степень повышения АД и давность АГ, у больных ХГН ключевую роль в ремоделировании прегломерулярных артериол играет состояние функции почек и степень нефросклероза.

С другой стороны, выявленные нами в 21,2% биоптатов больных ХГН пролиферативные изменения сосудистой стенки артериол с гиперплазией комплекса интима/медия, не коррелирующие с тяжестью АГ, подтверждают современные представления (Трасу, 1996, Hill и соавт., 2006) о том, что почечная пролиферативная артериопатия не всегда (и не только) является морфологическим признаком злокачественной системной АГ и др. заболеваний и состояний, входивших в критерии невключения в наше исследование (преэклампсия, активная системная красная волчанка, системная склеродермия, антифосфолипидный синдром, гемолитико-уремический синдром), но может рассматриваться и как один из признаков прогрессирования нефросклероза при ХГН.

В то же время выраженность гломеруломегалии (в 28,1%), отражающей перестройку почечной гемодинамики под влиянием гиперактивации почечной РАС, коррелировала с уровнем АД диаст., что может свидетельствовать о декомпенсации ауторегуляции почечного кровотока, направленной на защиту почечных клубочков от гемодинамического повреждения системной АГ. Дополнительными причинами развития гломеруломегалии могут быть также традиционные факторы риска нарушения системной и почечной гемодинамики – ожирение, высокий уровень гемоглобина, старший возраст, корреляция с которыми выявлена у обследованных нами больных ХГН.

Индекс гломерулосклероза с солидификацией сосудистых петель как отражающий более позднюю стадию, чем гломеруломегалия, гиперперфузионного поражения клубочков высоко коррелировал с индексами артериоглианоза и артериосклероза, также как и со степенью снижения СКФ, морфологическими индексами активности и склероза, обосновывая его значение как суммарного критерия поражения прегломерулярного и гломерулярного сосудистого русла.

Морфологические признаки ишемии клубочков по нашим данным не коррелировали ни с показателями тяжести АГ, ни с клиничко-лабораторными и морфологическими признаками активности/тяжести ХГН, ни с гиперплазией комплекса интима/медия прегломерулярных артериол, что можно объяснить участием

других механизмов нарушения клубочкового кровотока, в частности, гиперкоагуляционных.

Полученные нами результаты также свидетельствуют о тесной связи уменьшения плотности перитубулярного капиллярного русла с выраженностью ТИФ и степенью снижения СКФ. Уровень протеинурии, являющейся одним из главных факторов хронического повреждения тубулоцитов при ХБП, не коррелировал с этим морфологическим феноменом, что дает основание обсуждать независимое от протеинурического ремоделирования тубулоинтерстиция механизма влияния хронической гипоксии на прогрессирование ХБП.

Иммуногистохимическое изучение в биоптате почки больных ХГН продукции HIF-1 α , VEGF, THBSN1, ANG и PAX-2

Результаты ИГХ исследования представлены в таблицах 5-6 и рисунках 3-7. Интенсивность окрашивания на **HIF-1 α** в канальцах превышает примерно в 2 раза этот показатель в почечных клубочках (Таблица 5, Рисунок 3).

Таблица 5

Продукция биомаркеров гипоксического повреждения, нарушения ангиогенеза и гиперактивации PAC у обследованных больных

Фактор	N больных	M (95% CI)
<i>Маркер ишемии</i>		
HIF-1 α клуб.	74	1,4 (1,1; 1,6)
HIF-1 α туб.	76	2,8 (2,5; 3,1)
<i>Факторы регуляции ангиогенеза</i>		
VEGF клуб.	75	2,7 (2,3; 3)
VEGF туб.	76	3,4 (3,2; 3,7)
THBSN1 клуб.	75	1,7 (1,4; 1,9)
THBSN1 интерстиц.	76	1,8 (1,6; 2)
<i>Ангиотензиноген</i>		
ANG клуб.	62	0,6 (0,5; 0,8)
ANG туб.	62	4,0 (3,6; 4,3)
<i>Маркер дедифференциации почечных эпителиальных клеток</i>		
PAX-2 клуб.	75	1,5 (1,2; 1,8)
PAX-2 туб.	76	3,7 (3,4; 3,9)

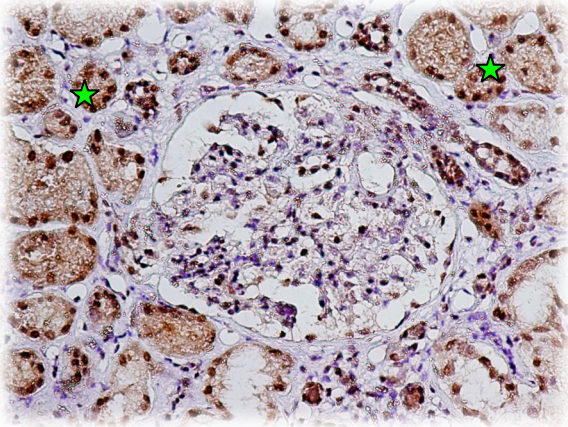
Таблица 6

Корреляции структурных изменений почечного микрососудистого русла с клинико-морфологическими показателями, отражающими традиционные факторы риска ремоделирования сосудов и признаки активности/тяжести ХГН

	HIF-1 α		VEGF		THBSN1		ANG		PAX-2	
	клуб.	туб.	клуб.	туб.	клуб.	интерст.	клуб.	туб.	клуб.	туб.
Возраст	0,22	0,29	0,20	0,22	-0,12	0,04	0,22	0,12	0,17	0,20
Длительность АГ	-0,36	-0,16	-0,24	-0,10	0,15	0,07	-0,13	-0,15	-0,15	-0,18
Длительность ХБП	-0,39	-0,43	-0,47	-0,26	0,32	0,07	-0,28	-0,10	-0,34	-0,30
ИМТ	0,15	0,26	0,14	0,08	-0,13	0,07	-0,11	-0,16	0,06	0,07
АД сист.	0,00	0,18	0,10	0,09	0,14	0,27	0,25	0,19	0,13	0,14
АД диаст.	-0,03	0,26	0,02	0,17	0,11	0,35	0,24	0,16	0,12	0,20
Число препаратов для снижения АД	0,08	0,10	0,07	0,20	0,03	0,00	0,11	0,34	-0,06	0,06
Гемоглобин	-0,03	-0,02	0,06	-0,06	-0,08	-0,12	-0,04	-0,14	0,00	0,04
Суточная ПУ	0,49	0,53	0,44	0,53	-0,17	0,15	0,01	-0,01	0,33	0,42
СКФ _{СКД EPI}	0,06	-0,02	0,06	0,01	-0,34	-0,31	-0,20	-0,15	0,05	0,08
Холестерин	0,33	0,46	0,34	0,34	-0,20	0,06	-0,08	-0,04	0,17	0,31
Мочевая кислота	-0,22	-0,20	-0,17	-0,09	0,17	0,01	-0,19	-0,01	-0,17	-0,07
Индекс активности	-0,22	-0,27	-0,26	-0,47	0,29	0,26	0,19	0,03	-0,13	-0,29
Индекс склероза	-0,25	-0,19	-0,29	-0,39	0,32	0,31	0,07	0,09	-0,19	-0,33
Пролиферация интимы/медии	0,02	-0,16	-0,21	-0,05	0,12	0,04	0,06	0,11	-0,07	0,00
Гиалиноз артериол	-0,23	-0,15	-0,23	-0,25	0,27	0,36	-0,02	0,02	-0,20	-0,23
Склероз артериол	-0,21	-0,13	-0,33	-0,30	0,33	0,32	0,06	0,18	-0,34	-0,39
Гломеруломегалия	0,22	0,23	0,22	0,29	-0,19	0,24	-0,17	0,00	0,35	0,29
Гломерулосклероз с солидиф. петель	-0,09	-0,02	-0,31	-0,28	0,25	0,44	-0,17	0,05	-0,18	-0,23
Ишемизированные клубочки	-0,25	-0,08	-0,21	-0,15	0,28	0,04	-0,34	-0,27	-0,18	-0,20
Плотность перитубулярных капилляров	0,35	0,12	0,27	0,13	-0,57	-0,70	-0,09	-0,20	0,24	0,24

Полужирным шрифтом выделены корреляции с $p < 0,05$

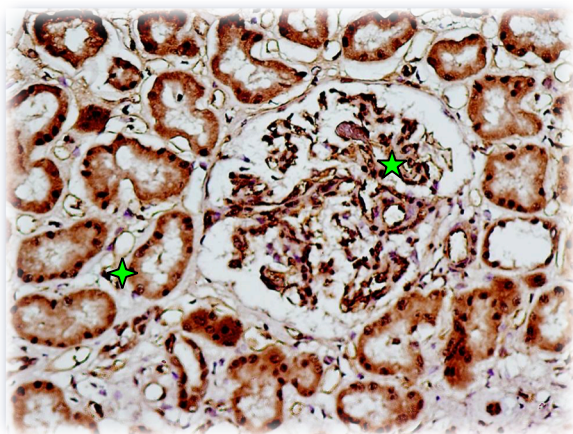
Рисунок 3
Выраженное накопление HIF-1 α в
клетках канальцевого эпителия



Выраженное накопление HIF-1 α в тубулярном эпителии с преимущественной ядерной локализацией (5 баллов), Слабая экспрессия HIF-1 α в ядрах гломерулярных клеток (2 балла). Иммунопероксидазный метод на парафиновых срезах. X200.

★ – окрашивание на HIF-1 α

Рисунок 4
Продукция VEGF в почечных
клубочках и канальцевом эпителии



Интенсивное (6 баллов) окрашивание на VEGF ядер и цитоплазмы мезангиальных клеток (★) и тубулоцитов (◆). Иммунопероксидазный метод на парафиновых срезах. X200

Интенсивность окрашивания на HIF-1 α как в клетках клубочков, так и в тубулоцитах прямо коррелировала с уровнем протеинурии как ключевым маркером почечного повреждения и известным фактором формирования ТИФ, подтверждая сопряженность механизмов протеинурического и гипоксического ремоделирования тубулоинтерстиция.

Также выявлена прямая корреляция данного показателя с уровнем общего холестерина сыворотки (который сам был связан с величиной протеинурии), возрастом, ИМТ и АД диаст.

Активатор ангиогенеза VEGF в больших количествах определялся как в эндотелиальных клетках капилляров клубочков и тубулоинтерстиция, так и в клетках канальцевого эпителия (Таблица 5, Рисунок 4), высоко коррелируя с накоплением HIF-1 α (индуктором продукции VEGF), а также с уровнем протеинурии, холестерина.

Интенсивность окрашивания тубулоцитов на VEGF отрицательно коррелировала с длительностью ХБП, морфологическими индексами активности и склероза, что свидетельствует об угасании продукции VEGF при наиболее тяжелом течении ХГН и нарастании ТИФ (Таблица 6).

Величина почечной продукции VEGF как важнейшего активатора ангиогенеза может по нашим данным определять состояние микрососудистого русла почек на всех уровнях: чем ниже продукция VEGF клубочками, тем больше выражен

склероз артериол, гломерулосклероз с солидификацией петель, и тем меньше плотность перитубулярного капиллярного русла.

Продукция VEGF тубулоцитами положительно коррелировала с выраженностью гломеруломегалии, которая отражает гиперактивацию почечной РАС, участвующей в развитии канальцевой гипоксии.

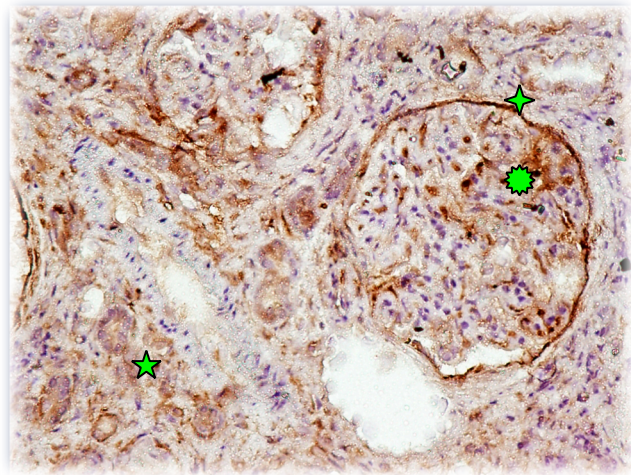
THBSN1, являющийся антагонистом VEGF, обнаруживался в клубочках (в капсуле и мезангии) и интерстиции – примерно в равном соотношении (Таблица 5, Рисунок 5). При снижении функции почек и наличии морфологических признаков выраженного нефросклероза продукция THBSN1 увеличивалась (Таблица 6). Высокий уровень THBSN1 был также ассоциирован с выраженным артериолосклерозом и снижением плотности перитубулярных капилляров, что подтверждает его роль как ингибитора ангиогенеза.

ANG в клубочках выявлялся в незначительных количествах, но в большом количестве определялся в канальцевом эпителии (Таблица 5, Рисунок 6). Его продукция у обследованных пациентов варьировала в широких пределах. Отмечена прямая корреляция данного показателя с числом получаемых больными антигипертензивных препаратов, в первую очередь, ингибиторов АПФ.

Транскрипционный фактор **PAX-2**, являющийся маркером дедифференциации клеток эпителия, определялся в

Рисунок 5

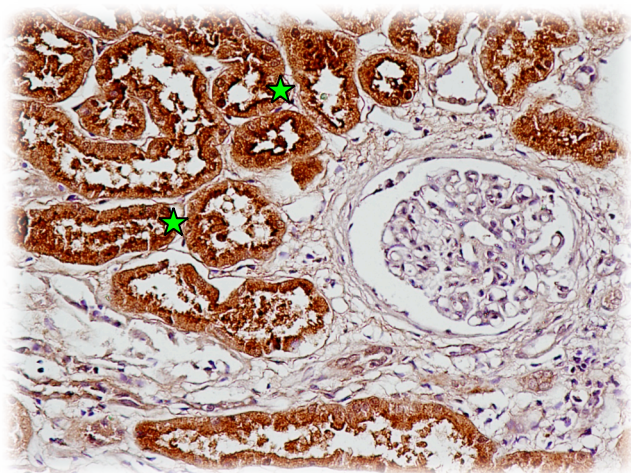
Продукция THBSN1 в почечных клубочках и интерстиции



Умеренное (3 балла) равномерное накопление THBSN1 в мезангии клубочков (★), субкапсулярно (★), а также в интерстиции (★). Иммунопероксидазный метод на парафиновых срезах. X200

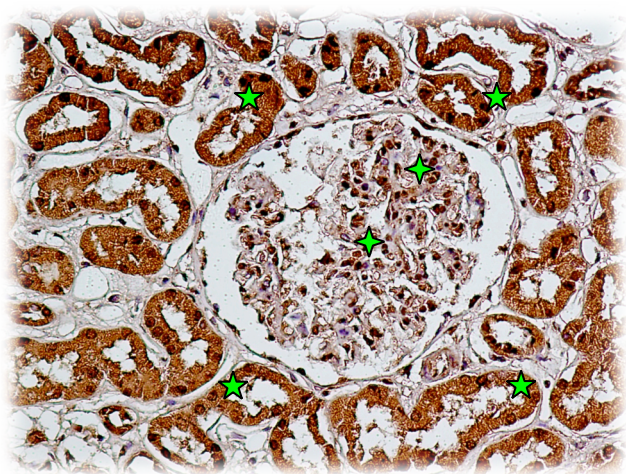
Рисунок 6

Интенсивная иммуногистохимическая реакция к ANG в канальцевом эпителии



Интенсивная экспрессия (5 баллов) ANG в тубулоцитах (★). Отсутствие продукции ANG в клубочках. Иммунопероксидазный метод на парафиновых срезах. X200

Рисунок 7
Интенсивная продукция PAX-2 в
тубулоцитах и умеренная – в ядрах
подоцитов клубочков



Интенсивная продукция (5 баллов) PAX-2 в тубулоцитах (★), и умеренная (2-3 балла) экспрессия PAX-2 в некоторых клубочках – в ядрах подоцитов (◆). Иммунопероксидазный метод на парафиновых срезах. X200

клубочках (подоцитах и клетках капсулы) и, в 2 раза большем количестве, в тубулоцитах (Таблица 5, Рисунок 7), высоко коррелировал с уровнем протеинурии, тканевыми маркерами гипоксии – HIF-1 α и VEGF (Таблица 6), что еще раз свидетельствует о содержательном повреждающем воздействии на канальцевый эпителий протеинурии и гипоксии.

При высокой степени нефросклероза и артериолосклероза продукция PAX-2 снижалась, отражая активацию процессов эпителиально-мезенхимальной трансдифференциации.

Иммунохимическое изучение в моче больных ХГН VEGF-A, THBS1, ANGPT2, NGAL, COL4

Результаты иммунохимического исследования мочи представлены в таблицах 7-9. Сопоставление экскреции трех исследованных мочевых биомаркеров регуляции ангиогенеза – VEGF-A, THBS1, ANGPT2, показало, что между ними имеется прямая связь: VEGF-A и THBS1 одинаковым образом прямо коррелировали с уровнем ANGPT2 ($R_s = 0,37$ и $0,37$, соответственно; $p < 0,001$).

Изменения всех трех регуляторов ангиогенеза однонаправленным образом коррелировали с основными показателями активности/тяжести ХГН (Таблица 9).

Высокая мочевая экскреция VEGF-A, THBS1, ANGPT2 отмечалась при наличии у больных выраженной протеинурии, нефротического синдрома и связанной с ними гиперлипидемией – в клинико-прогностических группах 3 и 4 (Таблица 7).

В то же время не наблюдалось связи данных показателей с уровнем АД. При этом уровень экскреции ANGPT2 коррелировал с числом получаемых антигипертензивных препаратов, отражающим тяжесть АГ, а уровень экскреции VEGF-A отрицательно коррелировал с длительностью АГ (Таблица 9).

Таблица 7

Уровень мочевой экскреции маркеров почечного повреждения и регуляторов ангиогенеза в группах, выделенных в зависимости от выраженности ПУ и степени снижения СКФ

Клиническая группа	Мочевые биомаркеры, медиана (25-я перцентиль; 75-я перцентиль)				
	VEGF-A, пг/г	THBS1, пг/г	ANGPT2, фг/г	NGAL, пг/г	COL4, пг/г
Гр. 1: ПУ \leq 3,5 СКФ \geq 60, n = 40	30,9 (15,8; 64,5)	0,0 (0,0; 59,2)	0,0 (0,0; 0,0)	54,2 (0,0; 380,7)	165,8 (114,7; 245,7)
Гр. 2: ПУ \leq 3,5 СКФ $<$ 60, n = 18	19,0 (16,5; 36,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	69,2 (18,2; 425,8)	271,5 (175,4; 309,1) #
Гр. 3: ПУ $>$ 3,5 СКФ \geq 60, n = 16	43,7 (33,7; 66,9) * ‡	309,8 (6,4; 634,1) @ †	0,0 (0,0; 1795,6)	362,0 (80,0; 1473,4) #	261,0 (182,8; 320,0) #
Гр. 4: ПУ $>$ 3,5 СКФ $<$ 60, n = 8	114,0 (43,8; 154,3) @ †	218,2 (19,3; 1585,7) # §	10479,1 (3366,6; 68219,6) @ † §	3894,3 (918,7; 10809,6) & † §	842,4 (459,7; 2347,1) & † §
Все больные, n = 82	34,9 (20,0; 65,0)	0,0 (0,0; 227,3)	0,0 (0,0; 146,6)	176,9 (17,0; 808,8)	228,9 (153,0; 322,0)

Полужирным шрифтом выделены достоверные различия ($p < 0,05$)

* - $0,05 \leq p < 0,1$ vs Гр. 1,

- $p < 0,05$ vs Гр. 1,

@ - $p < 0,01$ vs Гр. 1,

& - $p < 0,001$ vs Гр. 1,

§ - $p < 0,05$ vs Гр. 2,

† - $p < 0,01$ vs Гр. 2,

‡ - $p < 0,001$ vs Гр. 2,

§ - $p < 0,05$ vs Гр. 3.

Таблица 8

Частота высокой мочевого экскреции маркеров почечного повреждения и регуляторов ангиогенеза у больных ХГН в зависимости от показателей активности/тяжести поражения почек и других факторов риска прогрессирования ХБП

Клинический показатель	Частота высокой (>75-й перцентиля) мочевого экскреции биомаркеров:				
	VEGF-A, пг/г	THBS1, пг/г	ANGPT2, фг/г	NGAL, пг/г	COL4, пг/г
Пол: мужской / женский	33,3% / 18,2%, p = 0,1195	25,0% / 25,0%, p = 1,0000	22,2% / 27,3%, p = 0,6038	27,8% / 22,7%, p = 0,6038	29,7% / 22,2%, p = 0,4383
Старший возраст (>50 лет для мужчин и >55 лет для женщин): да / нет	36,4% / 20,7%, p = 0,1483	36,4% / 20,7%, p = 0,1483	31,8% / 22,4%, p = 0,3857	31,8% / 22,4%, p = 0,3857	54,6% / 15,0%, p = 0,0003
Индекс массы тела (ИМТ) ≥ 25 кг/м ² : да / нет	33,3% / 14,3%, p = 0,0510	33,3% / 14,3%, p = 0,0510	28,9% / 20,0%, p = 0,3624	33,3% / 14,3%, p = 0,0510	34,8% / 13,9%, p = 0,0315
Курение (на момент обследования или в анамнезе): да / нет	25,0% / 25,0%, p = 1,0000	27,8% / 22,7%, p = 0,6038	25,0% / 25,0%, p = 1,0000	30,6% / 20,5%, p = 0,2993	33,3% / 19,6%, p = 0,1563
Прием анальгетиков 1 раз в неделю и чаще: да/нет	35,3% / 21,3%, p = 0,2349	23,5% / 26,2%, p = 0,8216	23,5% / 26,2%, p = 0,8216	29,4% / 24,6%, p = 0,6872	35,3% / 22,2%, p = 0,2694
Протеинурия: < 0,5 / 0,5-3,5 / >3,5	9,5% / 22,9% / 41,7%, p = 0,0424	9,5% / 14,3%, / 54,2% p = 0,0004	14,3% / 14,3% / 50,0%, p = 0,0033	9,5% / 17,1% / 50%, p = 0,0027	4,6% / 27,8% / 41,7%, p = 0,0146
Нефротический синдром: да / нет	46,2% / 14,8%, p = 0,0024	50,0% / 13,0%, p = 0,0003	46,2% / 14,8%, p = 0,0024	46,2% / 14,8%, p = 0,0024	46,2% / 16,1%, p = 0,0037
Артериальная гипертензия: да / нет	23,2% / 29,2%, p = 0,5731	28,6% / 16,7%, p = 0,2598	25,0% / 25,0%, p = 1,0000	30,4% / 12,5%, p = 0,0910	33,3% / 8,0%, p = 0,0155
Гематурия более 10 эритроц. в п/з: да / нет	14,3% / 28,8%, p = 0,1867	0,0% / 33,9%, p = 0,0021	9,5% / 30,5%, p = 0,0565	9,5% / 30,5%, p = 0,0565	14,3% / 29,5%, p = 0,1681
СКФ ниже 60 мл/мин/1,73 м ² : да / нет	23,1% / 25,9%, p = 0,7828	23,1% / 25,9%, p = 0,7828	34,6% / 20,4%, p = 0,1682	38,5% / 18,5%, p = 0,0537	38,5% / 19,6%, p = 0,0693
Анемия: да / нет	36,8% / 21,7%, p = 0,1849	42,1% / 20,0%, p = 0,0535	63,2% / 11,7%, p = 0,0000	52,6% / 15,0%, p = 0,0008	50,0% / 16,4%, p = 0,0025

Полужирным шрифтом выделены достоверные различия (p < 0,05)

Корреляции уровня мочевой экскреции регуляторов ангиогенеза с показателями активности/тяжести поражения почек и другими факторами риска прогрессирования ХБП, а также маркерами почечного повреждения у больных ХГН

	VEGF-A	THBS1	ANGPT2
Возраст	$R_s = 0,1; p \geq 0,1$	$R_s = -0,07; p \geq 0,1$	$R_s = 0,04; p \geq 0,1$
Длительность ХБП	$R_s = -0,12; p \geq 0,1$	$R_s = 0,03; p \geq 0,1$	$R_s = 0,13; p \geq 0,1$
Длительность АГ	$R_s = -0,25; p < 0,05$	$R_s = -0,15; p \geq 0,1$	$R_s = -0,01; p \geq 0,1$
Систолическое АД	$R_s = 0,12; p \geq 0,1$	$R_s = 0,11; p \geq 0,1$	$R_s = 0,12; p \geq 0,1$
Диастолическое АД	$R_s = 0,05; p \geq 0,1$	$R_s = 0,10; p \geq 0,1$	$R_s = 0,09; p \geq 0,1$
Число препаратов для снижения АД	$R_s = 0,11; p \geq 0,1$	$R_s = 0,07; p \geq 0,1$	$R_s = 0,23; p < 0,05$
Суточная протеинурия	$R_s = 0,51; p < 0,0001$	$R_s = 0,49; p < 0,0001$	$R_s = 0,35; p < 0,01$
СКФ	$R_s = 0,05; p \geq 0,1$	$R_s = 0,15; p \geq 0,1$	$R_s = -0,08; p \geq 0,1$
Мочевая кислота	$R_s = -0,16; p \geq 0,1$	$R_s = -0,22; 0,05 \leq p < 0,1$	$R_s = -0,09; p \geq 0,1$
Холестерин	$R_s = 0,39; p < 0,001$	$R_s = 0,32; p < 0,01$	$R_s = 0,31; p < 0,01$
Триглицериды	$R_s = 0,24; p < 0,05$	$R_s = 0,25; p < 0,05$	$R_s = 0,25; p < 0,05$
Гемоглобин	$R_s = -0,22; 0,05 \leq p < 0,1$	$R_s = -0,15; p \geq 0,1$	$R_s = -0,38; p < 0,001$
СОЭ	$R_s = 0,27; p < 0,05$	$R_s = 0,21; 0,05 \leq p < 0,1$	$R_s = 0,28; p < 0,05$
Фибриноген	$R_s = 0,5; p < 0,001$	$R_s = 0,2; p \geq 0,1$	$R_s = 0,38; p < 0,01$
NGAL	$R_s = 0,36; p < 0,01$	$R_s = 0,36; p < 0,01$	$R_s = 0,54; p < 0,0001$
COL4	$R_s = 0,42; p < 0,001$	$R_s = 0,1; p \geq 0,1$	$R_s = 0,49; p < 0,0001$

Для каждого показателя даны коэффициент корреляции R_s и степень достоверности p . Полужирным шрифтом выделены достоверные корреляции ($p < 0,05$)

Также не выявлено корреляции уровня экскреции VEGF-A, THBS1, ANGPT2 с величиной СКФ, однако сочетание сниженной СКФ (< 60 мл/мин/1,73 м²) с массивной ПУ как показателей активности/тяжести ХГН характеризовалось более высоким уровнем ANGPT2 по сравнению с пациентами со столь же высокой ПУ, но без почечной дисфункции (Таблица 7). Уровень экскреции VEGF-A, THBS1, ANGPT2 не был связан и с выраженностью нефросклероза по данным биопсии почки.

Высокий (> 75 -й перцентили) уровень экскреции VEGF-A наблюдался достоверно чаще среди пациентов с «подоцитарными» морфологическими вариантами ХГН (МИ, ФСГС и МН), чем с «мезангиальными» вариантами (МПГН и МКГН) – соответственно 43,8% и 7,1%, $p < 0,05$, при отсутствии достоверных различий по выраженности протеинурии.

Нами отмечена тесная связь между уровнем мочевого экскреции регуляторов ангиогенеза и маркеров почечного повреждения – NGAL и COL4, которая, в свою очередь, определялась выраженностью протеинурии и степенью снижения функции почек (Таблица 9).

Более высокий уровень экскреции с мочой регуляторов ангиогенеза у больных с выраженной ПУ не объясняется только механическим их проникновением из сыворотки крови через поврежденный клубочковый фильтр, а, принимая во внимание результаты морфологической части исследования, свидетельствуют в пользу локально-почечного их происхождения как биомаркеров, отражающих изменения микрососудистого русла почек и гипоксическое ремоделирование тубулоинтерстиция.

ВЫВОДЫ

1. У больных ХГН – одной их наиболее клинически значимых форм ХБП, выявляются локально почечные нарушения системы ангиогенеза, ведущие к гипоксическому ремоделированию тубулоинтерстиция как основы прогрессирования ХБП, которое характеризуется комплексом морфофункциональных изменений с продукцией ассоциированных с этими изменениями биомаркеров, выявляющихся как в ткани почки, так и в моче больных и коррелирующих с традиционными клинико-лабораторными показателями активности/тяжести ХГН (протеинурией, снижением СКФ) и прогнозом заболевания.
2. Наиболее частыми изменениями внутрпочечной гемодинамики у больных ХГН являются гиперперфузия клубочков, о чем свидетельствуют морфологические признаки прегломерулярного артериолосклероза (у 49%), гломеруломегалия (29%) и гломерулосклероз с солидификацией сосудистых петель (37%), а также ишемия почечного тубулоинтерстиция, проявляющаяся облитерацией перитубулярного капиллярного русла. При этом степень артериолосклероза и облитерации перитубулярных капилляров коррелирует с выраженностью нефросклероза и снижением СКФ, но не с уровнем системного АД.
3. По мере нарастания выраженности нефросклероза на поздних стадиях ХБП наблюдается постепенное снижение плотности перитубулярного капиллярного русла с одновременным снижением продукции стимулятора ангиогенеза VEGF и повышением продукции антиангиогенного фактора THBS1, создавая основу для гипоксического ремоделирования тубулоинтерстиция и прогрессирования ТИФ.
4. Накопление в канальцевом эпителии маркера гипоксии HIF-1 α у больных ХГН может отмечаться на всех стадиях ХБП, даже без предшествующих значительных нарушений васкуляризации тубулоинтерстиция. Повышенный уровень маркеров гипоксии – HIF-1 α в тубулоцитах и CA-9 в моче сочетается с повышенным уровнем маркеров повреждения канальцевого эпителия – PAX-2

в ткани почек и NGAL в моче, свидетельствуя о роли гипоксии в хроническом повреждении почек и формировании ТИФ при ХГН.

5. Тканевая экспрессия и мочевая экскреция исследованных биомаркеров нарушений ангиогенеза в почке – VEGF, THBS1, ANGPT2 и гипоксии – HIF1 α и CA-9, достоверно ($p < 0,05$ для всех показателей) коррелируют с величиной протеинурии, что подтверждает связь ремоделирования микрососудистого русла почек с активностью ХГН, указывает на содружественную роль протеинурического и гипоксического повреждения канальцевого эпителия в формировании ТИФ и дает возможность рассматривать эти биомаркеры как показатели высокого риска прогрессирования ХБП.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении диагностической биопсии почки больным ХГН в алгоритм морфологического исследования биопсийного материала целесообразно включать иммуногистохимическое исследование продукции почечными тубулоцитами и/или клетками интерстиция VEGF, THBS1, HIF-1 α , PAX-2, определение плотности перитубулярного капиллярного русла при использовании моноклональных антител к CD34.
2. Нарушение баланса между величиной экспрессии VEGF и THBS1 в пользу последнего наряду с обеднением перитубулярных капилляров и накоплением в цитоплазме тубулоцитов HIF-1 α и PAX-2 следует расценивать как неблагоприятный прогностический признак.
3. Оценка экскреции с мочой биомаркеров, отражающих состояние локально-почечной системы регуляции ангиогенеза и развитие гипоксического ремоделирования тубулоинтерстиция является неинвазивным методом, позволяющим осуществлять мониторинг активности/тяжести ХБП на разных стадиях прогрессирования, дополняя традиционный показатель повреждения почек – протеинурию.
4. Высокая экскреция VEGF, CA-9, NGAL и COL4, отражающих гипоксическое ремоделирование почечного тубулоинтерстиция, может рассматриваться также как новый критерий эффективности и безопасности патогенетической и нефропротективной терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Швецов М.Ю., Чжэн А., Козловская Л.В., Серова А.Г., Травкина Е.В., Мухин Н.А. Мочевая экскреция факторов регуляции ангиогенеза и маркеров повреждения почек при хроническом гломерулонефрите: значение в оценке прогрессирования // Терапевтический архив. – 2015. – № 6. – С. 75-82.
2. Камышова Е.С., Швецов М.Ю., Бурденный А.М., Чжэн А., Кутырина И.М., Носиков В.В. Ассоциация полиморфных маркеров генов TNF, IL6 и IL10 с клинико – морфологическими особенностями хронического гломерулонефрита // Клиническая нефрология. – 2016. – № 1. – С. 12-16.

3. Shvetsov M., Bobkova I., Kamyshova E., Rudenko T., Kuznetsova L., Zheng A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for renal injury in chronic glomerulonephritis (CGN) // XLVII European Renal Association European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA) Congress. – 27 июня 2010г.. – Мюнхен, Германия. – Abstract Su367.
4. Швецов М.Ю., Бобкова И.Н., Камышова Е.С., Руденко Т.Е., Чжэн А. Липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов, (NGAL) как маркер хронического повреждения почек у больных гломерулонефритом // Сборник тезисов VII съезда Научного общества нефрологов России. – 19-22 октября 2010г.. – Москва. – С. 143-144.
5. Чжэн А., Швецов М.Ю., Бобкова И.Н., Ли О.А. Уровень сосудистого эндотелиального фактора роста а типа (VEGF A) и карбоангидразы IX (CA 9) мочи у больных хроническим гломерулонефритом: связь с клинической активностью заболевания и нарушением функции почек // Сборник тезисов VII съезда Научного общества нефрологов России. – 19-22 октября 2010г.. – Москва. – С. 136-137.
6. 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 // XLVIII European Renal Association European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA) Congress. – 25 июня 2011г.. – Прага, Чехия. – Abstract F283.
7. Швецов М.Ю., Чжэн А., Козловская Л.В., Серова А.Г., Травкина Е.В., Мухин Н.А. Значение мочевой экскреции факторов регуляции ангиогенеза в оценке прогрессирования хронического гломерулонефрита // Сборник тезисов VIII съезда Научного общества нефрологов России. – 11-13 ноября 2015г.. – Москва. – С. 111-112.
8. Чжэн А., Швецов М.Ю., Козловская Л.В., Серова А.Г., Травкина Е.В., Мухин Н.А. Уромодулин и коллаген 4 типа как мочевые биомаркеры активности и тяжести поражения почек при хроническом гломерулонефрите // Сборник тезисов VIII съезда Научного общества нефрологов России. – 11-13 ноября 2015г.. – Москва. – С. 107-109.
9. Камышова Е.С., Бурденный М.М., Швецов М.Ю., Чжэн А., Кутырина И.М., Носиков В.В. Изучение ассоциации полиморфных маркеров генов TNF, IL6 и IL10 с особенностями клинической картины в дебюте хронического гломерулонефрита // Сборник тезисов VIII съезда Научного общества нефрологов России. – 11-13 ноября 2015г.. – Москва. – С. 45-47.

АННОТАЦИЯ

Чжэн Аньтай (Китайская Народная Республика)

Прогностическое значение тканевых и мочевых биомаркеров гипоксии и нарушения локально-почечного ангиогенеза при хронической болезни почек

У больных хроническим гломерулонефритом (ХГН) как одной из наиболее клинически значимых форм хронической болезни почек (ХБП) исследовали тканевую экспрессию в биоптатах почки и экскрецию с мочой биомаркеров, отражающих выраженность гипоксического повреждения тканей и состояние системы регуляции ангиогенеза для оценки вклада гипоксического ремоделирования тубулоинтерстиция в прогрессирование ХБП.

На 1 этапе работы изучили 90 биоптатов почки больных ХГН с морфометрической оценкой изменений почечных артериол, клубочковых и перитубулярных капилляров и иммуногистохимическим определением фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и его антагониста тромбоспондина-1 (THBS1), ангиотензиногена (ANG) и фактора транскрипции Paired box protein 2 (PAX-2), отражающего дедифференциацию эпителиальных клеток почек в ответ на повреждение. На основании результатов 1 этапа на 2 этапе у клинически сопоставимых 82 больных ХГН пациентов исследовали в утренней моче иммуноферментным методом концентрацию маркера гипоксии карбоангидразы-9 (CA-9), регуляторов ангиопоэза VEGF, THBS1, ангиопоэтина-2 (ANGPT2), маркеров повреждения канальцевого эпителия и активации фиброгенеза липокалина-2 (NGAL) и коллагена IV (COL4). Полученные результаты сопоставляли с клинико-лабораторными показателями активности/тяжести ХГН, отражающими его прогрессирующее течение.

Преобладали структурные изменения микрососудистого русла, отражающие гиперперфузионное поражение почечных клубочков артериолосклероз (у 49%), гломеруломегалия (29%) и гломерулосклероз с солидификацией сосудистых петель (37%), которые сочетались с облитерацией перитубулярного капиллярного русла. Морфометрические индексы артериолосклероза и плотности перитубулярных капилляров достоверно ($p < 0,05$) коррелировали с выраженностью нефросклероза ($R = 0,83$ и $R = -0,66$, соответственно) и СКФ ($R = -0,32$ и $R = 0,57$), но не с уровнем системного АД, а выраженность гломеруломегалии коррелировала с уровнем диастолического АД ($R = 0,27$), что свидетельствует о нарушении защитных механизмов ауторегуляции почечного кровотока у больных ХГН. Снижение плотности перитубулярных капилляров на поздних стадиях ХБП ассоциировано со снижением локальной почечной продукции стимулятора ангиогенеза VEGF и повышением продукции его антагониста THBS1.

Накопление в канальцевом эпителии маркера гипоксии HIF-1 α у больных ХГН может отмечаться на всех стадиях ХБП, опережая нарушение васкуляризации тубулоинтерстиция, обусловленное нефросклерозом. Повышенный уровень маркеров гипоксии – HIF-1 α в тубулоцитах и CA-9 в моче сочетается с повышенным уровнем маркеров повреждения канальцевого эпителия – PAX-2 в ткани почек и NGAL в моче, свидетельствуя о роли гипоксии в хроническом повреждении почек при ХГН.

Тканевая экспрессия и мочевая экскреция исследованных биомаркеров нарушений ангиогенеза в почке – VEGF, THBS1, ANGPT2 и гипоксии – HIF1 α и CA-9, достоверно ($p < 0,05$ для всех показателей) коррелируют с величиной протеинурии, что указывает на содружественную роль протеинурического и гипоксического повреждения канальцевого эпителия в формировании тубулоинтерстициального фиброза и дает возможность рассматривать эти биомаркеры как показатели высокого риска прогрессирования ХБП.

Zheng Antai (People's Republic of China)

The prognostic value of hypoxia and angiogenesis biomarkers in kidney tissue and urine in chronic kidney disease patients

The aim of the study was to reveal the expression in kidney biopsy tissue and urinary excretion of hypoxia and angiogenesis biomarkers in chronic glomerulonephritis (CGN) patients in order to evaluate the role of hypoxic tubulointerstitial remodeling in chronic kidney disease (CKD) progression.

Morphometric analysis of renal arterioles, glomerular and peritubular capillaries (PTC) in kidney biopsy tissue of 90 CGN patients was performed. The intensity of vascular and glomerular injury and nephrosclerosis so as immunohistochemical staining for CD34 (as a marker of peritubular capillary density), Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1 α), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Thrombospondin-1 (THBS1), Angiotensinogen (ANG), and epithelial dedifferentiation biomarker Paired Box Protein 2 (PAX-2) in renal glomeruli and tubulointerstitium, were estimated by semiquantitative method. In morning urine samples of 82 CGN patients levels of hypoxia biomarker Carbonic anhydrase IX (CA-9), VEGF-A, THBS1, Angiopoietin 2 (ANGPT2), Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), and type IV Collagen (COL4) were measured by ELISA.

The most prevalent microvascular changes in kidney biopsy tissue were arteriolosclerosis (in 49%), glomerulomegaly (29%), glomerulosclerosis with capillary solidification (37%). These preglomerular and glomerular vascular changes, which reflect glomerular hyperperfusion, were associated with PTC rarefaction.

Morphometric arteriolosclerosis and PTC density indices significantly ($p < 0,05$) correlated with nephrosclerosis index ($R = 0.83$ and $R = -0.66$, respectively) and eGFR ($R = -0.32$ и $R = 0.57$), but they did not correlate with SBP or DBP, number of BP lowering drugs. Glomerulomegaly index correlated with DBP ($R = 0.27$) pointing the dysregulation of intrarenal blood flow in CGN pts. PTC rarefaction in developed CKD stages was associated with decreased VEGF expression and increased THBS1 in kidney glomeruli and tubulointerstitium.

Glomerular and tubular staining for HIF-1 α did not correlate with intrarenal vascular changes. High staining for HIF-1 α in tubulocytes and high CA-9 urinary excretion as hypoxia biomarkers was associated with high tubular staining for PAX-2 and high NGAL excretion, respectively, in evidence to the role of hypoxia in chronic kidney injury in CGN.

Expression in kidney tissue and urinary excretion of hypoxia and angiogenesis biomarkers (VEGF, THBS1, ANGPT2, HIF1 α , and CA-9) significantly ($p < 0.05$) correlate with proteinuria level reflecting close association of proteinuric and hypoxic remodeling of tubulointerstitium in CKD progression.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	Артериальная гипертония
АД	Артериальное давление
АД диаст.	Диастолическое артериальное давление
АД сист.	Систолическое артериальное давление
АТ	Антитела
БПГН	Быстропрогрессирующий гломерулонефрит
БРА	Блокаторы рецепторов ангиотензина II 1 типа
ИАПФ	Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
ИГХ	Иммуногистохимическое исследование
ИМТ	Индекс массы тела
МИ	Болезнь минимальных изменений
МКГН	Мезангиокапиллярный гломерулонефрит
МН	Мембранозная нефропатия
МПГН	Мезангиопролиферативный гломерулонефрит
НС	Нефротический синдром
ПУ	Протеинурия
РАС	Ренин-ангиотензиновая система
СКФ	Скорость клубочковой фильтрации
СКФ _{СКД-ЕРІ}	Скорость клубочковой фильтрации, рассчитанная по формуле СКД-ЕРІ
ТИФ	Тубулоинтерстициальный фиброз
ТПН	Терминальная почечная недостаточность
ФПГН	Фибропластический гломерулонефрит
ФСГС	Фокальный сегментарный гломерулосклероз
ХБП	Хроническая болезнь почек
ХГН	Хронический гломерулонефрит
ANGPT2	Ангиопоэтин 2 типа
АТГ	Ангиотензиноген
СА-9	Карбоангидраза 9 типа
CD34	Cluster of Differentiation molecule 34, поверхностный антиген, маркер эндотелиальных и стволовых клеток
COL4	Коллаген IV типа
HIF	Hypoxia Inducible Factor – фактор, индуцируемый гипоксией
HIF-1a	Hypoxia Inducible Factor 1 alpha – альфа-субъединица фактора, индуцируемого гипоксией, 1 типа
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin – липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов
PAX-2	Paired box protein 2 – фактор транскрипции, содержащий парный домен, 2 типа
THBS1	Thrombospondin-1 – тромбоспондин 1 типа
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor – сосудистый эндотелиальный фактор роста
VEGF A	Vascular Endothelial Growth Factor A– сосудистый эндотелиальный фактор роста А типа