

© И.Н.Бобкова, Н.В.Чеботарева, Л.В.Козловская, В.А.Варшавский, Е.П.Голицина, 2006
УДК 616.611-002-036.12:616.61-002.17]-07:616.633.96

*И.Н. Бобкова, Н.В. Чеботарева, Л.В. Козловская, В.А. Варшавский,
Е.П. Голицина*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСКРЕЦИИ С МОЧОЙ МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОТАКСИЧЕСКОГО ПРОТЕИНА-1 (MCP-1) И ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА- β 1 (TGF- β 1) - НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ТУБУЛОИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ

*I.N. Bobkova, N.V. Chebotareva, L.V. Kozlovskaya, V.A. Varshavsky,
E.P. Golitsina*

DETERMINATION OF URINARY EXCRETION OF MONOCYTE CHEMOTACTIC PROTEIN-1 (MCP-1) AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 (TGF- β 1) IS AN INVASIVE METHOD OF ASSESSMENT OF TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

Отдел нефрологии Научно-исследовательского центра и кафедра патологической анатомии Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Определить содержание в моче и почечной ткани больных ХГН профиброгенных медиаторов - моноцитарного хемотаксического протеина (MCP-1) и трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1) и уточнить их значение для оценки процессов воспаления и фиброза в почке и как критериев прогноза. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** У 63 больных активными протеинурическими формами ХГН изучены экскреция с мочой MCP-1 и TGF- β 1 с помощью иммуноферментного (ELISA) метода, экспрессия TGF- β 1 в ткани почки иммуногистохимическим методом. Для измерения площади интерстиция использован морфометрический метод. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** У больных активными протеинурическими формами ХГН в отличие от здоровых лиц отмечается повышение экскреции с мочой MCP-1 и TGF- β 1. Установлено, что уровень мочевого экскреции MCP-1 у больных с нефротическим синдромом был достоверно выше, чем у больных с умеренным мочевым синдромом. Особенно высоким мочевого показатель MCP-1 был у больных со стойкой почечной недостаточностью. Экскреция TGF- β 1 зависела, главным образом, от величины креатининемии, наиболее высокой она была у больных с выраженной протеинурией и стойким нарушением функции почек. Интенсивная экскреция TGF- β 1 с мочой обнаруживалась у тех больных ХГН, у которых выявлялась экспрессия этого цитокина в интерстиции почки, что подтверждает его локально-почечное происхождение. Определена связь мочевого показателей MCP-1 и TGF- β 1 с величиной тубуло-интерстициального фиброза. Впервые показана высокая информативность (чувствительность и специфичность) мочевого показателя MCP-1 и TGF- β 1 как маркеров степени интерстициального фиброза и их значение в определении прогноза ХГН. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты исследования демонстрируют важную роль MCP-1 и TGF- β 1 в процессе ремоделирования тубулоинтерстиция. Изученные показатели являются маркерами ТИФ, а определение уровня MCP-1 и TGF- β 1 в моче является информативным неинвазивным методом, позволяющим мониторировать активность заболевания и стадии фиброза, оценивать прогноз ХГН.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, интерстициальный фиброз, моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1), мочевого экскреция.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to determine the concentration in urine and renal tissue of CGN patients of fibrinogenic mediators - monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and to specify their significance for the assessment of processes of inflammation and fibrosis in the kidney and as the prognosis criteria. **PATIENTS AND METHODS.** Urinary excretion of MCP-1 and TGF- β 1 using the immunoenzyme method (ELISA), and expression of TGF- β 1 in kidney tissue using the immunohistochemical method were studied in 63 patients with active proteinuric forms of CGN. The interstitium area was measured by the morphometric method. **RESULTS.** Patients with active proteinuric forms of CGN unlike healthy subjects had higher urinary excretion of MCP-1 and TGF- β 1. It was found that the level of urinary excretion of MCP-1 in patients with nephrotic syndrome was reliably higher than that in patients with a mild urinary syndrome. The urinary index MCP-1 was particularly high in patients with a stable renal failure. TGF- β 1 excretion depended mainly on the creatininemia value, being the highest in patients with pronounced proteinuria and stable impairment of the kidney function. Intensive urinary excretion of TGF- β 1 was observed in patients with CGN in whom expression of this cytokine in the kidney interstitium was revealed which confirmed its local-renal origin. The relationship of the urinary indices of MCP-1 and TGF- β 1 was determined with the value of tubulo-interstitial fibrosis. For the first time, high informative value (sensitivity and specificity) of urinary indices of MCP-1 and TGF- β 1 as markers

of the interstitial fibrosis degree was demonstrated and their significance in the prognosis of CGN. **CONCLUSION.** The investigation has demonstrated an important role of MCP-1 and TGF- β 1 in the process of remodeling of tubulointerstitium. The indices under study are markers of TIF, and the determination of the level of MCP-1 and TGF- β 1 in urine is an informative noninvasive method allowing activity of the disease and fibrosis stage to be monitored, and to estimate the prognosis of CGN.

Key words: chronic glomerulonephritis, interstitial fibrosis, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), urinary excretion.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее важных проблем нефрологии является изучение механизмов прогрессирования хронического гломерулонефрита (ХГН) с целью торможения развития терминальной почечной недостаточности (ПН), требующей применения дорогостоящей заместительной почечной терапии хроническим гемодиализом. В настоящее время благодаря многочисленным исследованиям, главным образом в эксперименте, подтверждено первостепенное значение тубулоинтерстициального фиброза (ТИФ) как патоморфологической основы ПН, и установлена важная роль протеинурии (ПУ) в его развитии. Показано, что нефротоксический эффект ПУ реализуется через интерстициальное воспаление, заканчивающееся развитием ТИФ [1]. В основе ТИФ лежат процессы накопления компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) (фибронектина, коллагена I, III, IV типов, ламинина и гепарансульфат-протеогликанов) и апоптоз тубулярных клеток, ведущие к атрофии канальцев, расширению интерстициального объема и потере перитубулярных капилляров [2, 3].

Центральным звеном в этих механизмах является активация тубулярных эпителиальных клеток под действием повреждающих компонентов ПУ с продукцией ими молекулярных медиаторов воспаления и фиброза – моноцитарного хемотаксического протеина -1 (MCP-1) и трансформирующего фактора роста – β 1 (TGF- β 1), осуществляющих паракринно-аутокринную регуляцию процессов формирования и прогрессирования ТИФ [4, 5].

В последние годы появилась возможность определения отдельных молекулярных медиаторов воспаления в моче больных ХГН, однако имеются лишь единичные клинические работы, демонстрирующие взаимосвязь уровня экскреции MCP-1 и TGF- β 1 со степенью выраженности тубулоинтерстициального повреждения и фиброза [6, 7].

Цель исследования – определить содержание в моче и почечной ткани больных ХГН профиброгенных медиаторов MCP-1 и TGF- β 1 и уточнить их значение для оценки интерстициального фиброза в почке и как критериев прогрессирования заболевания.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 63 больных активными формами ХГН – 32 женщины и 31 мужчина в возрасте от 15

до 69 лет (в среднем 33 ± 15 лет). Контрольную группу составили 12 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с больными ХГН. Среди 63 пациентов у 25 диагноз ХГН был подтвержден морфологически (у 10 выявлен мезангиопролиферативный нефрит, у 3 – мезангиокапиллярный нефрит, у 3 – мембранозный нефрит, у 2 – фокально-сегментарный гломерулосклероз, у 2 – нефрит с минимальными изменениями, у 5 – фибропластический гломерулонефрит).

Результаты исследования молекулярных медиаторов сравнивали в 3-х группах больных, различающихся по степени выраженности ПУ и ПН. I группу составили 23 пациента с умеренным мочевым синдромом: ПУ в среднем $1,3 \pm 0,2$ г/сут.; у 7 из них выявлялась изолированная ПУ субнефротического уровня, у 9 – в сочетании с умеренной эритроцитурией (до 30–40 в п/зр.) и у 7 – с выраженной эритроцитурией (сплошь все п/зр.). Функция почек у всех больных I группы была в пределах нормы (креатинин сыворотки крови $1,06 \pm 0,04$ мг/дл), артериальная гипертензия (максимально до 170/100 мм рт. ст.) наблюдалась у 3 больных. Во II группу включены 29 пациентов с нефротическим синдромом (НС), признаки которого были отчетливо выражены: отеки различной степени и локализации, ПУ, достигавшая в отдельных случаях 12–13,5 г/сут (в среднем $5,5 \pm 0,6$ г/сут.), гипоальбуминемия ($2,5 \pm 0,11$ г/дл), у 19 больных также выявлялась гематурия. У 13 больных наряду с массивной ПУ отмечалось преходящее нарушение функции почек (креатинин от 1,6 мг/дл до 2,8 мг/дл, в среднем $1,9 \pm 0,07$ мг/дл) и артериальная гипертензия, что расценено как наличие у них остронефритического синдрома. В III группу вошли 11 больных, у которых наряду с выраженной ПУ (у 13 – нефротического уровня, в среднем $4,6 \pm 0,8$ г/сут) и гематурией (от 10–15 в п/зр. до сплошь в п/зр.) отмечалось стойкое нарушение функции почек (креатинин сыворотки крови в среднем $3,6 \pm 0,8$ мг/дл) и высокая артериальная гипертензия (АД систолическое 160 – 220 мм рт.ст., АД диастолическое 100 – 130 мм рт. ст.). При морфологическом исследовании ткани почки у больных этой группы выявлен значительный фиброз.

Экскрецию с мочой профиброгенных молекулярных медиаторов исследовали методом прямого иммуноферментного анализа (ELISA) с ис-

пользованием для MCP-1 системы BioSource International, Immunoassay Kit (США, Бельгия), для TGF- β 1 – системы DRG MTPL EIA-1864 (ФРГ). Мочевые показатели MCP-1 и TGF- β 1 были стандартизованы по величине креатинина в утренней моче.

У 16 больных параллельно исследованию TGF- β 1 в моче изучили экспрессию этого цитокина в ткани почки с помощью иммуногистохимического пероксидазного метода с использованием моноклональных антител мыши к TGF- β 1 (клон TB21, BioSource International, USA, Belgium). Результат реакции оценивали по интенсивности коричневой окраски.

В ткани почек 45 больных ХГН определяли экспрессию маркера миофибробластов – гладкомышечного α -актина (α -ГМА) иммуногистохимическим пероксидажным методом с использованием моноклональных антител мыши к α -ГМА (клон 1A4, DAKO, Дания). Результат реакции оценивали морфометрически по интенсивности коричневой окраски (модифицированный принцип Weibel). Для контроля указанные показатели также были оценены в 7 образцах ткани здоровой почки, полученной в ходе различных оперативных вмешательств (без признаков опухоли или сосудистой патологии).

Среди 45 больных ХГН, которым была проведена биопсия почки, у 25 измеряли площадь (относительный объем) интерстиция коркового слоя почки (в 10–12 полях зрения при увеличении $\times 400$) и степень клеточной воспалительной лейкоцитарной инфильтрации по количеству ядер в корковом слое почек на участке в 1,5 мм² с использованием программ для морфометрии (ДиаМОРФ, ADOBE PHOTOSHOP CS). Данные морфометрического анализа сравнивались с клиническими и морфологическими признаками активности нефрита и с мочевыми показателями MCP-1 и TGF- β 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех больных ХГН уровень экскреции MCP-1 с мочой был выше, чем у здоровых лиц. У больных с НС он был достоверно выше, чем у пациентов с умеренным мочевым синдромом (табл. 1). Установлена прямая достоверная корреляция между уровнем MCP-1 в моче и величиной суточной ПУ, а также показателем ПУ/креатинин мочи ($R_s = 0,51$ и $0,55$ соответственно, $p < 0,001$). Наиболее высокая мочевая экскреция MCP-1 отмечена у больных III группы с выраженной ПН (см. табл. 1). О профиброгенной направленности действия этого хемокина свидетельствуют и результаты рассмотрения мочевых показателей MCP-1 отдельно в группе больных с НС: у пациентов с НС и пре-

Таблица 1
Уровень экскреции MCP-1 и TGF- β 1 с мочой больных ХГН

Группа обследованных	n	MCP-1 пг/мл/ креатинин мочи	TGF- β 1 пг/мл/ креатинин мочи
Здоровые	12	0,34 (0,21-0,86)	0,2 (0-0,4)
I. Больные ХГН с мочевым синдромом	23	4,08* (1,7-7,6)	1,65* (0,7-2,2)
II. Больные ХГН с НС	29	7,85** (4,6-16)	1,1* (0,4-2,4)
III. ХГН со стойкой ПН	11	26,5** (16-56)	2,5** (2,2-3,5)

* $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, • $p < 0,01$ по сравнению с I группой, ° $p < 0,05$ по сравнению с I и II группами. В таблице представлены показатели медианы и интерквартильного размаха.

Таблица 2
Уровень экскреции MCP-1 с мочой больных ХГН в зависимости от локализации фиброза в клубочках и интерстиции (n=25)

Локализация фиброзных изменений в почке	n	MCP-1 пг/мл/креатинин мочи
1. Гломерулосклероз (-) ТИФ (-)	12	4,6 (1,9-8,1)
2. Гломерулосклероз (+) ТИФ (-)	5	2,9 (2,1-2,9)
3. Гломерулосклероз (+) ТИФ (+)	8	30,5** (18,3-52,5)

* $p < 0,01$ по сравнению с 1, ° $p < 0,01$ по сравнению с 2. В таблице представлены показатели медианы и интерквартильного размаха.

ходящей ПН он был достоверно выше (11,0 пг/мл (7,2-29)), чем у больных с сохранной функцией почек (6,5 пг/мл (3,1-10,5)) ($p < 0,05$).

Участие продуцируемого эпителиальными клетками канальцев MCP-1 в механизме формирования интерстициального фиброза подтверждается результатами проведенного нами морфометрического анализа: у больных с площадью интерстиция более 10% экскреция с мочой MCP-1 была достоверно выше, чем у больных с площадью интерстиция менее 10% ($p < 0,05$). У больных с площадью интерстиция более 20% эта разница была высоко достоверной ($p < 0,001$). Между этими показателями выявлена сильная прямая корреляция ($r = 0,8$, $p < 0,001$). Роль MCP-1 как основного хемокина, действующего преимущественно на территории интерстиция, подтверждается также тем, что его уровень был минимальным при преимущественной локализации фиброза в почечных клубочках, и в 6 раз выше – при локализации фиброза в интерстиции почки (табл. 2).

В отличие от MCP-1, уровень экскреции с мочой фиброгенного фактора роста TGF- β 1 у больных с умеренным мочевым и нефротическим синдромами практически не различался, хотя и был достоверно выше, чем у здоровых лиц. В то же время у больных III группы со стойкой ПН мочевая экскреция TGF- β 1 была значимо выше не только по сравнению со здоровыми лицами, но и по срав-

Таблица 3

Экспрессия α -ГМА миофибробластами в интерстиции почек больных ХГН (n=45)

Группы больных ХГН	n	Экспрессия α -ГМА в интерстиции, %
I. С мочевым синдромом	11	9,0 (6,6-10,0)
II. С НС	15	9,5 (7,1-11,9)
II.1. с НС без ПН		
II.2. с НС и преходящей ПН	6	21,6* (21,4-24,2)
III. С НС и стойкой ПН	13	25,3* (18,6-31,7)

• $p < 0,05$, * $p < 0,01$ по сравнению с I и II.1.

нению с больными двух предыдущих групп (см. табл. 1).

Выявлена прямая корреляция между показателем экскреции TGF- β 1 и уровнем сывороточного креатинина ($r_s = 0,5$, $p < 0,05$) и обратная корреляция между уровнем TGF- β 1 в моче и скоростью клубочковой фильтрации, рассчитанной по Кокрофту-Гоулту ($r_s = -0,6$, $p < 0,01$).

При морфометрическом исследовании биоптатов ткани почки больных ХГН нами установлена зависимость между площадью интерстиция и величиной экскреции TGF- β 1 с мочой: при площади интерстиция более 20%, то есть при выраженном интерстициальном фиброзе, экскреция TGF- β 1 была значительно выше (2,5 пг/мл (2,2-4,6)), чем при площади интерстиция менее 20% (0,7 пг/мл (0,14-1,7)). Высокий уровень TGF- β 1 в моче обнаруживался у тех больных ХГН, у которых выявлялась экспрессия этого цитокина в интерстиции почки, что подтверждает, с одной стороны, его локально-почечное происхождение, с другой стороны, участие TGF- β 1 в формировании интерстициального фиброза.

У больных ХГН с ПН нами отмечена тесная корреляция между экскрецией с мочой MCP-1 и

TGF- β 1 ($r_s = 0,6$, $p < 0,01$), свидетельствующая о дружественном участии этих цитокинов в процессе формирования интерстициального фиброза.

В интерстиции почек больных ХГН изучили содержание основных продуцентов экстрацеллюлярного матрикса – миофибробластов, экспрессирующих α -ГМА. Наиболее высокой экспрессия α -ГМА в интерстиции была у больных ХГН с НС и преходящей ПН и у пациентов со стойкой ПН, то есть высокоактивными прогрессирующими формами ХГН (табл. 3). Именно у больных с ПН отмечена прямая корреляция между количеством миофибробластов в интерстиции и уровнем креатинина в сыворотке крови ($r_s = 0,7$, $p < 0,001$).

При морфометрическом исследовании отмечена зависимость экспрессии α -ГМА в интерстиции от площади ТИФ ($r_s = 0,8$, $p < 0,001$). Нами выявлена сильная прямая корреляция между уровнем интерстициальной экспрессии α -ГМА и показателями мочевого экскреции MCP-1 ($R_s = 0,7$, $p < 0,05$) и TGF- β 1 ($R_s = 0,6$, $p < 0,05$). Обнаружена экспрессия α -ГМА клетками канальцев почек, причем именно у больных с высоким содержанием TGF- β 1 в моче. Это подтверждает установленный преимущественно в эксперименте факт трансформации под влиянием TGF- β 1 клеток тубулярного эпителия в миофибробласты, которые пополняют пул интерстициальных миофибробластов, продуцирующих ЭЦМ.

Для определения информативности изученных нами мочевых показателей MCP-1 и TGF- β 1 как тестов оценки интерстициального фиброза мы сопоставили разные концентрации этих цитокинов с площадью ТИФ. Оказалось, что с наибольшей точностью формирование интерстициального фиброза (более 20% общей площади) отражают дискриминационные точки на уровне пересечения кривых чувствительности и специфичности: для мочевого показателя MCP-1 – концентрация более 20 пг/мл (чувствительность теста составляет 100%, специфичность 89%), а для TGF- β 1 – выше 2,0 пг/мл (чувствительность 83%, специфичность 78%) (рис. 1).

В клинических условиях с целью выявления больных с начальными (потенциально обратимыми) изменениями в интерстиции и определения возможных путей торможения дальнейшего прогрессирования фиброза важна ранняя диагностика ТИФ. Мы попытались установить минимальные концентрации MCP-1 и TGF- β 1 в моче, достаточные для того, чтобы судить о ранних интерстициальных изменениях. Было показано, что, начиная с уровня в моче 4,0 пг/мл, MCP-1 уже может отражать увеличение площади интерстиция более 10% (рис. 2). И хотя чувствительность (82%) и специфичность (75%) этого показателя экскреции MCP-

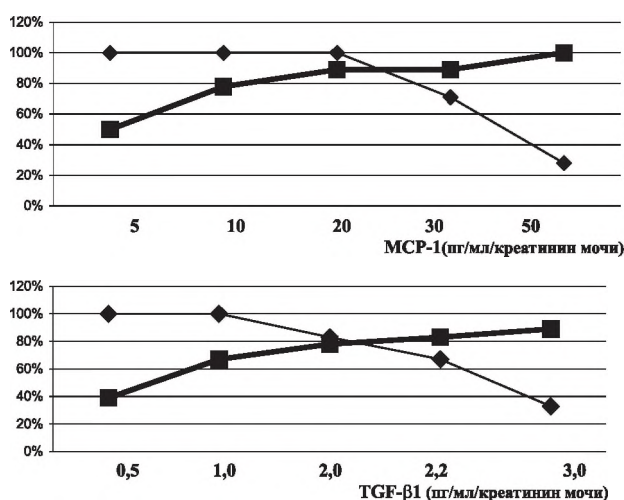


Рис. 1. Информативность показателей экскреции с мочой MCP-1 и TGF- β 1 для оценки выраженного интерстициального фиброза (>20% коркового слоя) почек у больных ХГН.

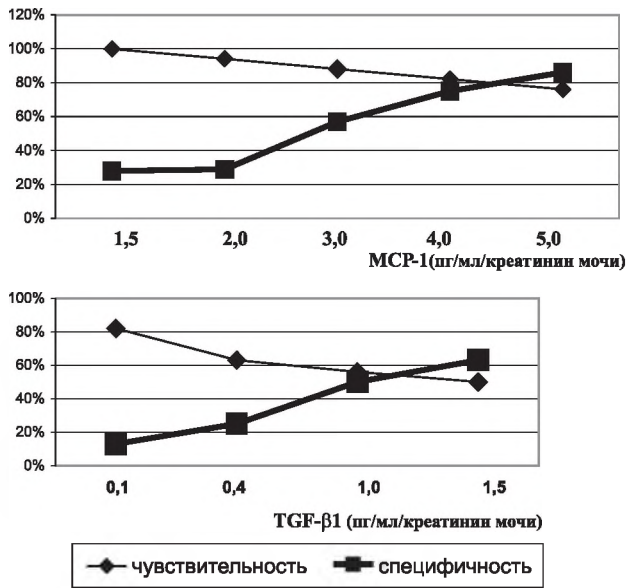


Рис. 2. Информативность показателей экскреции с мочой МСР-1 и TGF-β1 для оценки начальных фиброзных (>10% коркового слоя) изменений в интерстиции почек у больных ХГН.

1 были ниже, чем предыдущего, но достаточны для того, чтобы применять данный мочевого тест как маркер ранней фазы формирования фиброза (см. рис. 2). В то же время концентрация TGF-β1 в моче ниже 2 пг/мл оказалась недостаточно чувствительным (56%) и специфичным (50%) тестом оценки начальной стадии ТИФ (рис. 2). В этой связи мы считаем, что уровень TGF-β1 в моче более 2,0 пг/мл в сочетании с высокой концентрацией МСР-1 более 20 пг/мл является отражением уже сформированного фиброза.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время изучение молекулярных механизмов прогрессирования ХГН, среди которых важное место отводят профиброгенным цитокинам (хемокины, факторы роста), считают перспективным направлением в нефрологии. Интерес к этой проблеме значительно возрос в связи с появлением доступных методов определения уровня цитокинов в моче и ткани почки (иммунохимические методы, гибридизации *in situ* и др.), позволяющих оценивать активность и стадию почечного процесса и предполагать характер морфологических изменений в почках.

Важную роль в патогенезе ХГН играет хемокин МСР-1, который обеспечивает накопление в очаге воспаления моноцитов (макрофагов) и лимфоцитов, активирует эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудов, регулирует основные этапы острого и хронического воспаления в почке, его интеграцию с процессами накопления ЭЦМ, ведущими к ТИФ [5].

В экспериментальных исследованиях подтверждено, что МСР-1 вовлечен в прогрессирование ХГН, главным образом за счет тубулоинтерстициального повреждения. Так на модели нефротоксического нефрита было показано, что при одинаковой степени гломерулярных изменений более выраженное тубулоинтерстициальное повреждение развивается у мышей «дикого» типа, способных к экспрессии МСР-1, по сравнению с трансгенными мышами, не синтезирующими МСР-1 [8]. Было установлено, что в ткани почки больных ХГН МСР-1 экспрессируется преимущественно тубулярным эпителием, мононуклеарными клетками в зонах интерстициального воспаления, а также эндотелием сосудов интерстиция, и практически не продуцируется клетками клубочка [7].

В нашем исследовании отмечено повышение уровня МСР-1 в моче у больных ХГН по мере нарастания активности нефрита. Уровень МСР-1 в моче прямо коррелировал с величиной суточной протеинурии, что согласуется с современными представлениями о нефротоксическом действии ПУ и подтверждает результаты других клинических и экспериментальных работ [1, 9]. С. J. Burton и соавт. на культуре монослоя поляризованных тубулярных клеток показали, что под воздействием альбумина происходит секреция МСР-1 тубулярными клетками как в базолатеральных, так и в апикальных отделах [10]. Предполагают, что МСР-1, выделяемый тубулярными клетками со стороны апикальной мембраны, является основным его источником в моче при большинстве форм ХГН. Лишь небольшое количество МСР-1 поступает в просвет канальцев и в мочу, фильтруясь из крови через стенку капилляров клубочков. По-видимому, этот путь имеет большее значение при быстро прогрессирующих формах гломерулонефрита, когда выраженные воспалительные изменения, локализующиеся в клубочках, значительно изменяют их проницаемость, в том числе для воспалительных цитокинов [11].

МСР-1, секретируемый в базолатеральных отделах тубулярных клеток, поступает в интерстиций и способствует образованию в нем воспалительного инфильтрата. При исследовании биоптатов почек больных ХГН методом гибридизации *in situ* было показано, что моноциты/макрофаги воспалительного инфильтрата в интерстиции экспрессируют рецепторы к МСР-1, что подтверждает ведущую роль этого хемокина в формировании интерстициального воспаления [12].

О значении МСР-1 как основного хемокина, действующего преимущественно на территории интерстиция, свидетельствуют выявленные нами высоко значимые корреляции: между уровнем МСР-1 в

моче больных ХГН и величиной ПУ, а также между мочевым показателем МСР-1, степенью воспалительной клеточной инфильтрации интерстиция и площадью фиброза. Полученные взаимосвязи подтверждают существование при ХГН патогенетической цепи «протеинурия – тубулярная секреция МСР-1 – интерстициальное воспаление – фиброз».

Профиброгенное действие МСР-1 объясняют вызываемой им активацией синтеза макрофагами TGF- β 1. В условиях повышенной продукции TGF- β 1 происходит трансформация резидентных фибробластов в миофибробласты – основные профиброгенные клетки, обладающие способностью в большом количестве продуцировать компоненты ЭЦМ [13–16]. Мы отметили прямую сильную корреляцию между мочевыми показателями МСР-1 и TGF- β 1 у больных с нарушением функции почек, и именно у этих больных при исследовании биоптатов почек нами обнаружен фиброз интерстиция.

В нашем исследовании у всех больных ХГН с повышенным уровнем TGF- β 1 в моче мы выявили и его экспрессию в почке, главным образом в тубулоинтерстиции, в то время как в почке здоровых лиц и пациентов, имеющих низкий мочевой показатель TGF- β 1, он не обнаруживался. Допуская, что это может быть связано с недостаточной чувствительностью примененного нами метода окраски, мы, тем не менее, считаем возможным допустить, что экскретируемый с мочой TGF- β 1 имеет местное (в почке) происхождение и позволяет судить о выраженности процессов ТИФ. Подтверждением нашей точки зрения о том, что TGF- β 1 отражает выраженность фиброзных изменений в интерстиции, могут служить и установленные нами прямые корреляции между уровнем экскреции TGF- β 1 с мочой и уровнем сывороточного креатинина, а также площадью интерстиция.

В экспериментальных исследованиях установлено, что продукция TGF- β 1 происходит главным образом в клетках воспалительного инфильтрата в интерстиции почки. В работах с использованием культуры клеток показана возможность синтеза TGF- β 1 и тубулярными клетками [3]. Считают, что TGF- β 1 поступает к базолатеральной поверхности тубулярных клеток, которые начинают экспрессировать α -ГМА, отделяются от тубулярной базальной мембраны, мигрируют в интерстиций и, пополняя пул резидентных фибробластов, участвуют в продукции компонентов ЭЦМ и формировании ТИФ [13–17]. Можно полагать, что в более поздней фазе формирования ТИФ TGF- β 1 может проникать в мочу через многочисленные разрывы тубулярной базальной мембраны, возникающие в процессе миграции трансдифференцированных тубулярных кле-

ток (миофибробластов) в интерстиций. В нашем исследовании правомерность этой концепции подтверждает пиковое повышение уровня TGF- β 1 в моче больных III группы с почечной недостаточностью и морфологически доказанным интерстициальным фиброзом.

В подтверждение процессов трансдифференциации тубулярных клеток в интерстициальные профиброгенные миофибробласты мы выявили в биоптатах почек больных ХГН тяжелого прогрессирующего течения с почечной недостаточностью экспрессию α -ГМА как интерстициальными миофибробластами, так и клетками тубулярного эпителия. В нашем исследовании преимущественно в тубулоинтерстиции выявлялась и повышенная экспрессия фактора роста для миофибробластов – TGF- β 1, сочетающаяся с высокой экскрецией TGF- β с мочой этих больных.

Мы оценили информативность (специфичность и чувствительность) показателей экскреции с мочой МСР-1 и TGF- β 1 для мониторинга фиброгенеза в интерстиции почки при ХГН. Нами было показано, что МСР-1, начиная с уровня его в моче 4,0 пг/мл, может быть использован как маркер ранней фазы формирования фиброза (более 10% общей площади коркового слоя). В то же время уровень в моче МСР-1 более 20 пг/мл и TGF- β 1 более 2,0 пг/мл информативен как маркер уже сформированного фиброза (площадь интерстиция более 20%).

Полученные нами результаты согласуются с результатами исследования Wada T. и соавт., которые предложили использовать мочевые тесты для неинвазивной оценки стадий фиброза при ХГН и прогнозирования ответа на лечение [5, 7]. Tam F. и соавт. показали, что уменьшение уровня МСР-1 в результате иммуносупрессивной терапии является более ранним лабораторным маркером хорошего ответа на проводимую терапию, чем снижение величины протеинурии или уровня креатинина сыворотки, и напротив, сохранение высоких значений МСР-1 в моче является предиктором неблагоприятного прогноза и быстрого прогрессирования почечной недостаточности [11].

В целом результаты нашего исследования подтверждают, что интерстициальный фиброз – динамический процесс, а использование мочи как субстрата, тесно связанного с больным органом (почкой), может предоставить ценную информацию о процессах воспаления и фиброза в почке. В частности, определение в моче уровня профиброгенных цитокинов МСР-1 и TGF- β 1 является информативным неинвазивным методом оценки ТИФ. Есть основания считать, что изученные мочевые тесты найдут практическое применение для монито-

рирования активности заболевания, оценки его прогноза, обоснования терапии. Так выявление ранней, потенциально обратимой стадии фиброза является показанием для активной иммуносупрессивной терапии, в то же время констатация развернутой стадии фиброза обосновывает переход к преимущественно нефропротективной стратегии. По нашим данным, МСР-1, начиная с уровня в моче 4,0 пг/мл, является маркером формирующегося интерстициального фиброза, а высокий уровень экскреции МСР-1 с мочой (более 20 пг/мл) в сочетании с повышенной экскрецией TGF- β 1 (более 2,0 пг/мл) указывает на выраженность процессов фиброза в почке и обосновывает нефропротективную стратегию, то есть применение препаратов, преимущественно действующих на механизмы накопления фиброзной ткани в почке. Кроме уже применяемых с этой целью ингибиторов АПФ и блокаторов рецепторов к ангиотензину, в стадии разработки находится и ряд других средств с анти-TGF- β 1 и антихемокиновым эффектами [5, 18, 19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования определены два показателя, позволяющие оценивать степень фиброза в почке – уровень экскреции с мочой МСР-1 и TGF- β 1. Благодаря доступности материала исследования с помощью этих «мочевых» тестов стало возможным мониторировать процесс фиброгенеза на разных стадиях, что имеет важное практическое значение для оценки прогноза и определения тактики лечения больных хроническим гломерулонефритом. Изучение роли молекулярных медиаторов в механизмах индуцируемого протеинурией ремоделирования почечного интерстиция открывает перспективу включения средств, целенаправленно воздействующих на эти медиаторы (хемокины и TGF- β 1 и др.) в общую стратегию нефропротекции. Некоторые из них уже сегодня прошли успешную доклиническую апробацию.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Eddy AA. Proteinuria and interstitial injury. *Nephrol Dial transplant* 2004; 19: 277-281
2. Bohle A, Muller GA, Wehrmann W et al. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int* 1996; 54: 2-9
3. Bottinger EP, Bitzer M. TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600-2610
4. Schneider A, Panzer U, Zahner G et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int* 1999; 56 (1): 135-144
5. Wada T, Yokoyama H, Kobayashi K. Chemokines: new target molecules in renal diseases. *Clin Exp Nephrol* 2000; 4: 273-280
6. Honkanen E, Teppo A, Tornroth T et al. Urinary transforming growth factor-beta 1 in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 (12): 2562-2568
7. Wada T, Yokoyama H, Su S et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int* 1996; 49: 761-767
8. Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest* 1999; 103 (1): 73-80
9. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998; 20 (339):1448-1456
10. Burton CJ, Combe C, Walls J, Harris KPG. Secretion of chemokines and cytokines by tubular epithelial cells in response to proteins. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2628-2633
11. Tam FWK, Sanders JS, George A et al. Urinary monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) is a marker of active renal vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2761-2768
12. Cockwell P, Howie AJ, Adu D et al. In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 54 (3): 827
13. Bottinger EP, Bitzer M. TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600-2610
14. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776-1784
15. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1-12
16. Masszi A, Ciano CD, Sirokmany G et al. Central role in TGF- β 1-induced α -smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 284: 911-924
17. Fan JM, Ng YY, Hill PA et al. Transforming growth factor beta regulates tubular epithelial-myofibroblasts transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; 56(4): 1455-1467
18. Border WA, Okuda S, Languino LR et al. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature* 1990; 346: 371-374
19. Negri AL. Prevention of progressive fibrosis in chronic renal diseases: Antifibrotic agents. *J Nephrol* 2004; 17 (4): 496-503

Поступила в редакцию 02.10.2006 г.