

© Н.В.Чеботарева, Н.В.Непринцева, И.Н.Бобкова, Л.В.Козловская, В.А.Варшавский, 2015
УДК 616.611-002-036.12:577.15.04

*Н.В. Чеботарева¹, Н.В. Непринцева², И.Н. Бобкова^{1,2}, Л.В. Козловская³,
В.А. Варшавский⁴*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В МОЧЕ, СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ТКАНИ ПОЧКИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

¹Научно-исследовательский отдел нефрологии Научно-исследовательского центра; ² кафедра нефрологии и гемодиализа Института профессионального образования; ³ кафедра внутренних, профессиональных заболеваний и пульмонологии медико-профилактического факультета; ⁴ кафедра патологической анатомии лечебного факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова

*N.V. Chebotareva¹, N.V. Neprintseva², I.N. Bobkova^{1,2}, L.V. Kozlovskaya³,
V.A. Varshavskii⁴*

STUDY OF PROTECTIVE HEAT SHOCK PROTEINS IN URINE, SERUM AND KIDNEY TISSUE IN PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

¹Department of nephrology research center, ²department of nephrology and hemodialysis, ³Department of internal diseases and pulmonology, ⁴Department of pathological anatomy I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ – уточнить ценность определения белков теплового шока (БТШ) в моче в оценке активности и прогноза ХГН. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовано 75 больных с активными формами хронического ХГН: 1-я группа – 34 больных с мочевым синдромом и 2-я группа – 41 больной с нефротическим синдромом, у которых мочевого синдром был результатом неполной ремиссии нефротического синдрома. Группы сравнения – 10 больных с протеинурией менее 0,5 г/сут и 10 здоровых. Методом ELISA в сыворотке крови определяли уровень антител к БТШ-70, в моче – уровни БТШ-27 и БТШ-70, ИЛ-6 и ИЛ-10. В ткани почки (иммуногистохимическим пероксидазным методом) определяли экспрессию БТШ-70 в различных структурах; экспрессию FoxP3. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Экскреция БТШ-27 и БТШ-70 с мочой увеличивалась по мере нарастания активности ХГН. Установлены прямые корреляции концентрации в моче БТШ-27 и БТШ-70 с признаками активности ХГН. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Подтверждена возможность оценки механизмов «самозащиты» почки с помощью изучения одного из ее звеньев – БТШ.

Ключевые слова: НЕТ

ABSTRACT

THE AIM is to clarify the value of determination of heat shock proteins (HSP) in urine to assess the activity and prognosis of CGN. **PATIENTS AND METHODS.** Study included 75 patients with active forms of chronic GN: group 1 -34 patients with bladder syndrome and group 2 – 41 patient with nephrotic syndrome who have urinary syndrome was the result of incomplete remission of nephrotic syndrome. The comparison group of 10 patients with proteinuria < 0.5 g/day and 10 healthy. Method (ELISA) in serum was determined by the level of antibodies to HSP-70 in urinary levels of HSP-27 and HSP-70, IL-6 and IL-10. In kidney tissue (peroxidase immunohistochemical method) was determined by the expression of HSP-70 in various structures; the expression of FoxP3. **RESULTS.** Excretion of HSP-27 and -70 urine was increased by increasing the activity of CGN, Established direct correlation to the concentration in the urine HSP-27 and -70 with signs of activity CS. **CONCLUSION.** Confirmed kidney «self-defense» mechanisms capability assessment using the study of one of its parts – HSP.

Key words: chronic glomerulonephritis, nephrotic syndrome, heat shock proteins.

ВВЕДЕНИЕ

Среди механизмов, определяющих течение и исход заболеваний почек, в настоящее время наиболее изучены повреждающие звенья патогенеза. Однако в экспериментальных работах было по-

казано, что течение патологического процесса в почке, независимо от его этиологии, определяется балансом локально воздействующих повреждающих факторов и противостоящих им механизмов самозащиты, среди которых особое место занимают белки теплового шока (БТШ) [1–3].

Благодаря достижениям современной молекуляр-

Чеботарева Н.В. 143400, г. Красногорск, ул. Ленина, д. 27, кв. 16. Тел.: 8-905-543-42-50, e-mail: natasha_tcheb@mail.ru,

ной биологии и инновационным клеточным технологиям установлены фундаментальные защитные функции БТШ, которые заключаются в поддержании нормальной структуры белков в клетке [4].

Роль БТШ в механизмах, ограничивающих повреждение почечной ткани, а также иммунорегуляторная функция этих белков при хроническом гломерулонефрите (ХГН) изучены недостаточно. Данное направление исследований представлено, главным образом, экспериментальными и единичными клиническими работами по оценке экспрессии отдельных БТШ в различных структурах почки [5–7].

Вместе с тем, изучение БТШ, способных модулировать процессы повреждения, приобретает особый интерес для понимания основных закономерностей прогрессирования ХГН и представляется перспективным для разработки новых методов торможения нефросклероза.

В этой связи целью нашего исследования было оценить состояние системы «самозащиты» почки у больных с ХГН по уровню в моче, крови и экспрессии в почке основных защитных БТШ, уточнить значение изменений этих факторов в оценке активности и прогноза ХГН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Обследовано 75 больных с активными формами ХГН: 31 женщина и 44 мужчины в возрасте от 16 до 67 лет (в среднем 35,5 [27; 51] лет), наблюдавшихся в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова с 2011 по 2013 годы.

В 1-ю группу включены 34 пациента с выраженным мочевым синдромом (МС) – 23 больных, у которых ХГН изначально протекал с МС и персистировал в течение 7 [2; 12] мес, а также 11 больных, у которых МС был результатом неполной ремиссии нефротического синдрома (НС). Клинически эта группа характеризовалась протеинурией (ПУ) от 1 до 3,5 г/сут (2,4 [1,24; 3,5] г/сут); у 13 больных выявлялась изолированная ПУ субнефротического уровня, у 21 пациента ПУ сочеталась с эритроцитурией.

У 7 больных 1-й группы, наряду с ПУ, выявлено нарушение функции почек (креатинин от 1,26 до 2,97 мг/дл, в среднем 1,35 [1,27; 1,71] мг/дл, СКФ – 53,5 [49; 67]), как проявление высокой активности нефрита. У 5 пациентов, несмотря на прием антигипертензивных препаратов, выявлялась артериальная гипертензия (АГ) (АД 160–170/100 мм рт. ст.). Длительность нефрита в этой группе составила в среднем 45 [9,5; 96] мес.

2-ю группу составил 41 больной с ХГН с НС. По степени тяжести НС были выделены подгруппы: 2А, включающая 31 пациента с умеренным НС (ПУ 6,4 [4,8; 10] г/сут, альбумин сыворотки 27,7 [24,8; 30] г/л, общий белок сыворотки 46,6 [43,2; 49,7]), и 2Б, в которую вошли 10 больных с выраженным НС (анасарка, ПУ 11,32 [7,52; 18] г/сут, гипоальбуминемия менее 20 г/л – в среднем 19 [17,7; 19,9] г/л, общий белок сыворотки 34,45 [33,6–38,7] г/л).

У 15 больных 2-й группы НС сочетался с гематурией (от 10–15 до сплошь в поле зрения). АГ отмечалась у 9 пациентов. У 14 больных 2-й группы, наряду с НС, выявлено нарушение функции почек (креатинин 1,55 [1,39; 1,99] мг/дл, СКФ – 53 [42; 71]) как проявление высокой активности нефрита, у 6 из них также отмечались выраженная гематурия и АГ, которые расценивались в рамках остонефритического синдрома. Длительность нефрита во 2-й группе составила в среднем 11,5 [4; 42,5] мес, длительность НС к моменту обследования – 4 [2; 7] мес.

У 72 больных диагноз ХГН был подтвержден морфологически: у 29 выявлен мезангиопролиферативный нефрит (МПГН), у 13 – мезангиокапиллярный нефрит (МКГН), у 13 – мембранозный нефрит (МН), у 7 – фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), у 4 – болезнь минимальных изменений (МИ), у 6 – нефросклероз в исходе ХГН.

Группы сравнения были представлены 10 пациентами с неактивным ХГН (ПУ менее 0,5 г/сут – в среднем 0,23 [0,18; 0,3] г/сут; у 2 – больных микрогематурия до 15–20 в поле зрения, АГ отсутствовала или была умеренной, поддавалась коррекции антигипертензивными препаратами), а также 10 здоровыми лицами, сопоставимыми по полу и возрасту.

Наряду с общеклиническим обследованием, нами были изучены:

в моче (методом ELISA): уровни БТШ-27 и БТШ-70 – защитных белков-шаперонов клеточного происхождения; уровень провоспалительного интерлейкина (ИЛ) – ИЛ-6 и уровень основного противовоспалительного интерлейкина – ИЛ-10;

в сыворотке крови (методом ELISA): уровень антител (АТ) к БТШ-70 как отражение внеклеточных эффектов БТШ (показатель иммунорегуляторной функции этих белков);

в ткани почки (иммуногистохимическим пероксидазным методом): экспрессия БТШ-70 в различных структурах; экспрессия FoxP₃ – фактора транскрипции регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25+), секретирующих противовоспалительный ИЛ-10.

Результаты иммуногистохимического исследования изучаемых медиаторов оценивали полуколичественным методом: (–) экспрессия отсутствует; (+) очаги слабой экспрессии, (++) множественные очаги умеренной экспрессии, (+++) множественные очаги выраженной экспрессии.

С помощью морфометрического подсчета FoxP3+-ядер оценено число противовоспалительных клеток в ткани почки.

Для иммуногистохимического исследования использовали материал парафиновых срезов биопсий почек 39 пациентов с ХГН (пациенты отобраны на основании наличия достаточного количества материала в парафиновых блоках).

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных статистических методов с помощью программы STATISTICA 6,0. Для сравнения двух групп использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Достоверность различий частот в двух группах оценивали по χ^2 с поправкой Йетса. Для оценки прогностического значения показателей применен метод Каплана–Майера, достоверность различий определялась по лог-ранговому критерию.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У больных с ХГН нами выявлены изменения экскреции с мочой БТШ-27 и БТШ-70, характер которых зависел от клинических особенностей заболевания. Так, у пациентов с МС (1-я группа) эти показатели имели тенденцию к увеличению по сравнению с контрольными группами (таблица). Наиболее высокие индивидуальные значения были у 3 больных с яркими признаками активности ХГН – ПУ субнефротического уровня, выраженной эритроцитурией и нарушением функции почек.

У пациентов с НС (2-я группа) увеличение уровня БТШ-27 и БТШ-70 в моче было статистически значимым по сравнению со здоровыми, неактив-

ным ГН и пациентами с МС (см. таблицу). При выраженном НС (ШБ гр.) уровни БТШ-27 и БТШ-70 в моче были достоверно выше, чем при умеренном НС (2А группа) (см. таблицу).

У больных с ХГН с НС показатели экскреции БТШ-27 и БТШ-70 прямо коррелировали с величиной суточной ПУ ($R_s=0,40$, $p<0,05$ и $R_s=0,34$, $p<0,05$ соответственно) и обратно с уровнем альбумина сыворотки крови ($R_s=-0,36$, $p<0,05$ и $R_s=-0,31$, $p<0,05$ соответственно).

Мы не выявили зависимости уровня мочевого экскреции исследуемых БТШ от морфологических типов ХГН. Максимальные индивидуальные уровни БТШ-27 в моче отмечались у 2 больных с ФСГС и МН (22,4 и 15,37 нг/мл соответственно), а БТШ-70 – при МИ (1,699 нг/мл), ФСГС (1,628 нг/мл), МН (2,588 нг/мл). Именно у этих больных клиническая картина ХГН характеризовалась выраженным НС, у части больных в сочетании с дисфункцией почек.

Для подтверждения локально-почечного происхождения БТШ, экскретируемых с мочой, мы исследовали экспрессию БТШ-70 в ткани почки у больных с ХГН. У всех больных с активным ХГН с выявленной экскрецией БТШ-70 с мочой мы обнаружили этот белок и в ткани почки. Он выявлялся в клубочках (главным образом, в подоцитах, в меньшей степени – в париетальных клетках капсулы Шумлянско–Боумана), а также в тубулоинтерстиции (в эпителиальных клетках канальцев, строме, клетках лимфогиоцитарного инфильтрата, миофибробластах).

При всех активных протеинурических формах ХГН, независимо от его морфологического варианта, преобладала тубулоинтерстициальная локализация БТШ-70. Умеренная (++) и выраженная (+++) экспрессия БТШ-70 в тубулоинтерстиции отмечалась у 80% больных с НС и лишь у 30% пациентов с МС. В клубочках почек обследованных с ХГН с МС и НС выявлялась преимущественно слабая (+) (у 85 и 70%) и умеренная (++) (у 15 и 25%) экспрессия БТШ-70. Интенсивность тубулоинтерстициальной

Таблица

Уровень экскреции с мочой БТШ-27 и БТШ-70 у больных с ХГН

Группа	n	БТШ-27 (нг/мл)	БТШ-70(нг/мл)
Активный ХГН:	75		
1. ХГН с МС	34	0,76 [0,68; 1,14]	0,43[0,41; 0,45]
2. ХГН с НС	41	1,1 [0,73; 1,83] *	0,46 [0,43; 0,50] *
2А. НС умеренный	31	0,94[0,71; 1,73]	0,43[0,41; 0,51]
2Б. НС выраженный	10	1,88 [0,8; 7,195] * **	0,6 [0,5; 2,5] * **
Неактивный ХГН	10	0,72 [0,65; 0,98]	0,42 [0,41; 0,43]
Здоровые	10	0,73 [0,66; 0,96]	0,42 [0,40; 0,43]

Примечание. В таблице представлена медиана, в скобках – интерквартильный размах [25; 75 %]. * $p<0,05$ по сравнению с 1-й группой, неактивным ХГН и здоровыми; ** $p<0,05$ по сравнению с 2А группой (ХГН с умеренным НС).

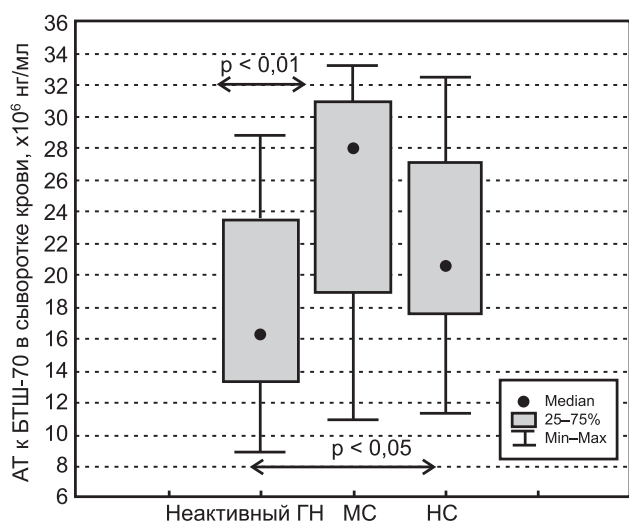


Рис. 1. Уровень антител к БТШ-70 в сыворотке крови у больных с ХГН.

экспрессии БТШ-70 прямо коррелировала с показателем его мочевой экскреции ($R_s=0,731$, $p<0,01$), отражая индукцию синтеза БТШ в этих структурах почки в процессе повреждения.

У больных с НС наиболее выраженная окраска БТШ-70 выявлялась в эпителиальных клетках канальцев и прямо коррелировала со степенью ПУ ($R_s=0,362$, $p<0,05$), что, как мы полагаем, может отражать индукцию синтеза БТШ в канальцах в ответ на повреждение не только иммунными факторами, но и компонентами ПУ.

Для оценки внеклеточных иммунорегуляторных эффектов БТШ-70 мы изучили уровень циркулирующих АТ к БТШ-70 в сыворотке крови и оценили баланс ИЛ-6 и ИЛ-10 в моче.

Сывороточный уровень АТ к БТШ-70 у больных с активным ХГН (как с МС, так и с НС) был значительно выше, чем у пациентов с латентным течением заболевания (рис. 1). В то же время, в общей группе пациентов с НС величина данного показателя была несколько ниже, чем при МС, и обратно коррелировала с уровнем ПУ ($R_s=-0,439$, $p<0,05$). Более сильная связь отмечена в группе больных с выраженным НС ($R_s=-0,974$, $p<0,05$).

При высокоактивном течении заболевания (см. рис. 1), клинически характеризующимся сочетанием тяжелого НС с дисфункцией почек, снижение уровня АТ к БТШ-70 было более выраженным, чем при умеренном НС с сохранной функцией почек ($20,3 [15,3; 24,3] \times 10^6$ и $25,6 [18,7; 31,9] \times 10^6$ нг/мл соответственно, $p<0,05$).

Нами установлено, что при нарастании активности ХГН от МС к НС и по мере усугубления степени выраженности НС наблюдается увеличение в моче провоспалительного ИЛ-6 и снижение

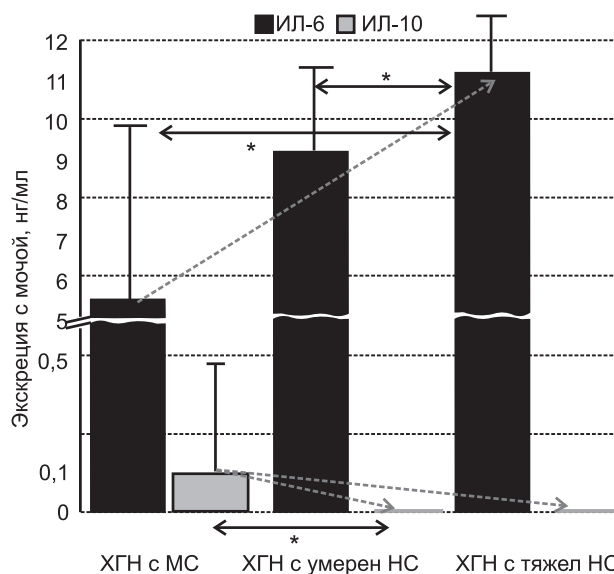


Рис. 2. Экскреция интерлейкинов 6 и 10 с мочой у больных с ХГН.

противовоспалительного ИЛ-10 (рис. 2).

Величина экскреции ИЛ-6 прямо коррелировала с выраженностью ПУ ($R_s=0,378$, $p=0,01$), уровнем креатинина сыворотки крови (для больных с НС $R_s=0,53$, $p<0,01$) и длительностью сохраняющейся активности ХГН ($R_s=0,344$, $p<0,01$).

По-нашему мнению, такой дисбаланс ИЛ-6/ИЛ-10 и снижение уровня АТ к БТШ подчеркивает значение нарушений иммунорегуляторных эффектов БТШ и недостаточности противовоспалительной защиты почки в целом при высокоактивных формах нефрита.

На это указывают и результаты проведенного нами морфометрического исследования. Мы оценили в инфильтратах количество регуляторных Т-лимфоцитов (FoxP3+), секретирующих ИЛ-10. У больных с ХГН с НС, по сравнению с пациентами с МС, отмечалось достоверное снижение в ткани почек FoxP3+-клеток ($2 [0,44; 4]$ и $8,5 [3; 16]$ в поле зрения соответственно, $p<0,05$), и именно в этой группе пациентов мы выявляли резкое снижение уровня ИЛ-10 в моче и АТ к БТШ-70 в сыворотке крови (см. рис. 1 и 2).

Полагая, что неэффективная регуляция хронического иммунного воспаления у больных с ХГН, в том числе с участием БТШ, может способствовать персистированию и дальнейшей хронизации болезни, и напротив, при состоятельности этой системы можно прогнозировать более благоприятное течение заболевания и ответ на иммуносупрессивную терапию у 37 больных с активным ХГН в зависимости от исходной величины АТ к БТШ-70.

Достижение ремиссии ХГН в течение ближайших месяцев иммуносупрессивной терапии на-

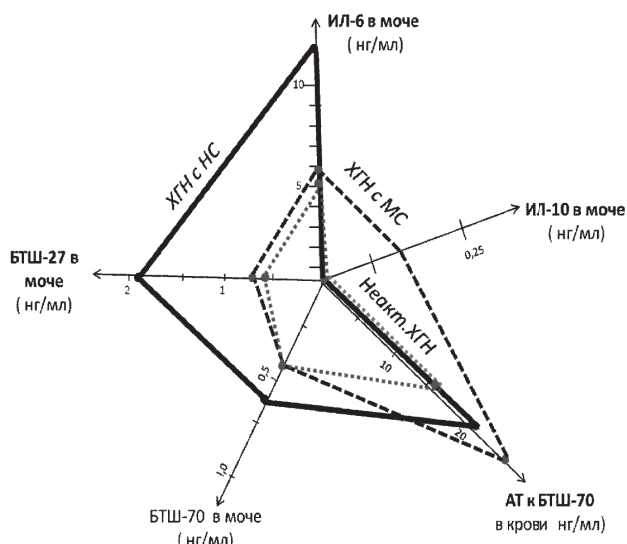


Рис. 3. Параметры системы «самозащиты» почки при разной степени активности ХГН.

блюдалось у больных с высоким (выше 21 пг/мл) исходным уровнем антител к БТШ-70 в сыворотке крови. Так, у 13 из 16 (80%) пациентов с высоким уровнем антител ответ на лечение был получен в течение 12 мес, у 8 (50%) – в течение ближайших 5 мес. Напротив, у 12 из 21 (57%) пациента с титрами антител ниже 21 пг/мл ХГН персистировал, несмотря на проводимое более 1 года лечение, рекомендованное для данных форм заболевания.

Комплексный анализ изменений изученных нами мочевых и сывороточных тестов на разных этапах течения ХГН показал, что по мере нарастания активности формируется дисбаланс повреждающих и защитных факторов с преобладанием воспалительных реакций (рис.3).

Об активности воспалительной реакции в ткани почки и выраженности клеточного повреждения у больных с ХГН свидетельствует снижение уровня АТ к БТШ-70 в сыворотке крови и ИЛ-10 в моче при повышении экскреции БТШ-27 и БТШ-70 и ИЛ-6 с мочой. Прогрессирующий характер этих нарушений является неблагоприятным прогностическим признаком, указывающим на риск хронизации болезни и худшего ответа на лечение.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время фундаментальными исследованиями подтверждена важная роль БТШ в восстановлении клеток, поврежденных под действием медиаторов воспаления, оксидативного стресса, различных токсинов, неблагоприятных факторов внешней среды и др. [4]. Эти защитные свойства БТШ связаны с их универсальными клеточными функциями: как белки-шапероны они участвуют

в образовании вторичной и третичной структуры протеинов, репарации поврежденных и элиминации денатурированных белков [4, 8, 9].

Среди белков теплового шока при ХГН особый интерес представляют БТШ-27, регулирующие структуру и функцию актин-содержащих клеток почки (подоцитов и тубулярных клеток), а также БТШ-70, который, как полагают, помимо внутриклеточной защиты, участвует в регуляции иммунного воспалительного ответа [3].

По нашим данным, экскреция БТШ-27 и БТШ-70 с мочой увеличивалась по мере нарастания активности ХГН, достигая наиболее высоких значений у больных с ХГН, особенно при его тяжелом течении. Нами установлены прямые корреляции мочевых показателей БТШ-27 и БТШ-70 с клинической активностью нефрита, в первую очередь, с выраженностью ПУ и почечной дисфункции, что отражает активацию механизмов внутриклеточной защиты в ответ на действие повреждающих факторов. В этой связи повышенный уровень БТШ в моче можно рассматривать не только как показатель индукции синтеза этих защитных белков в различных клетках ткани почки, но и как косвенный маркер клеточного повреждения.

Наиболее тесная связь с тяжестью ХГН была получена для БТШ-27, что находит объяснение в свете современных представлений об участии этого белка в поддержании цитоскелета подоцитов, и в частности, в регулировании формы его ножек – ключевого звена развития нефротической ПУ. Установлено, что защитными свойствами обладают нефосфорилированные олигомеры БТШ-27. В процессе клеточного повреждения происходит их фосфорилирование с помощью р38 МАРкиназы, что влечет за собой потерю связи БТШ-27 с актиновыми микрофиламентами и ремоделирование актиновой сети в клетке [10, 11]. В результате этих процессов наблюдается слияние ножек подоцитов с развитием ПУ, поврежденные подоциты слущиваются в мочевое пространство (подоцитурия), а БТШ начинают интенсивно выделяться из поврежденных клеток в мочу [12, 13]. Важную роль БТШ-27 играют в поддержании цитоскелета и других актин-содержащих клеток почек – канальцевых эпителиоцитов. Ослабление защитных свойств БТШ-27 в поврежденных эпителиальных клетках приводит к нарушению их каркаса, полярности, межклеточных контактов и связи с тубулярной базальной мембраной с последующим слущиванием эпителиоцитов в просвет канальца и формированием в местах оголения мембраны очагов тубулоинтерстициального фиброза.

В семейство БТШ-70 входят конституциональный белок БТШ-73кДа и индуцибельный белок БТШ-72кДа. В эксперименте установлено, что БТШ-73 в норме экспрессируется преимущественно клетками дистальных канальцев, в меньшей степени – проксимальных, а БТШ-72 – вдоль кортикопапиллярных областей [5]. При патологических состояниях экспрессия БТШ-73 и БТШ-72 локализуется преимущественно в области повреждающего воздействия. Так, при экспериментальном РАН-нефрозе внутриклеточная экспрессия БТШ-73 обнаруживалась в подоцитах, являющихся мишенью повреждению при данной форме нефрита, а также в тубулярных клетках, отражая их защитную реакцию на токсическое действие нефротической ПУ [5]. При экспериментальном остром повреждении почек ишемической и токсической природы усиленная экспрессия БТШ-73 и БТШ-72 выявлялась в проксимальных тубулярных клетках [14–16]. Т. Mueller и соавт. изучили экскрецию БТШ-72 с мочой у больных после пересадки почки. Резкое повышение экскреции БТШ-72 отмечено в первые часы после операции, что отражает процесс нарушения целостности тубулярного эпителия и может указывать на степень почечного повреждения [17].

В настоящее время имеются лишь единичные работы, посвященные изучению экспрессии БТШ-70 в ткани почки у больных с различными формами ХГН. Выявлена депозиция БТШ-70 в подоцитах, тубулярных клетках дистальных канальцев и собирательных трубочек, очагах интерстициальной инфильтрации [7, 18].

В нашем исследовании экспрессия БТШ-70 обнаружена у всех больных с ХГН с выявленной экскрецией БТШ-70 с мочой. В целом, изменения тканевых и мочевых показателей БТШ-70 у больных ХГН были однотипны: отмечались интенсивная экспрессия этого фактора в почке и усиленная его экскреция с мочой при активных формах ХГН, главным образом, при НС. Полученные нами данные подтверждают локально-почечное происхождение БТШ-70, выявляемого в моче, и указывают на возможность использования мочевых показателей БТШ для оценки механизмов защиты в почке и выраженности повреждения.

Экспрессия БТШ-70 выявлена нами у больных с ХГН в разных структурах ткани почки, но преимущественно в тубулоинтерстиции, что согласуется с результатами исследований других авторов. Интенсивность тубулоинтерстициальной экспрессии БТШ-70 коррелировала с уровнем экскреции БТШ-70 с мочой. Наиболее выраженная окраска на БТШ-70 у больных с НС выявлялась в

эпителиальных клетках канальцев, прямо коррелируя с выраженностью ПУ. В свете современных представлений о механизмах нефротоксичности ПУ это можно расценивать как защитную реакцию тубулярных клеток в ответ на повреждение не только иммунными факторами, но компонентами ПУ.

В последние годы, помимо внутриклеточной защитной функции БТШ-70, в литературе обсуждается их особая протективная роль, которая заключается в контроле хронического иммунного воспаления [19, 20]. Полагают, что внеклеточные эпитопы БТШ, экспрессируемые в очаге воспаления, распознаются Т-лимфоцитами с формированием регуляторных клонов реактивных Т-клеток CD4+CD25+ (FoxP3+), которые обеспечивают противовоспалительный эффект как за счет прямой элиминации цитотоксических Т-клеток, так и за счет гуморального звена – секреции противовоспалительных цитокинов, в первую очередь ИЛ-10 [21]. Есть основания полагать, что неэффективная иммунорегуляция противовоспалительного ответа с участием БТШ-70 может способствовать хронизации воспаления. Так, L. Marzec и соавт. показали, что снижение степени экспрессии БТШ-72 на поверхности моноцитов периферической крови у пациентов с рядом хронических заболеваний почек, а также у больных с терминальной почечной недостаточностью, сочетается с развитием системного воспаления [22].

Мы оценили взаимосвязь уровня в моче защитных БТШ с показателями мочевой экскреции противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и провоспалительного ИЛ-6. По мере нарастания активности нефрита и развития его прогрессирующих форм мы наблюдали увеличение экскреции с мочой БТШ-27 и БТШ-70, коррелирующие с уровнем ИЛ-6 в моче, как показателя активности иммунного воспаления в почке, в то время как уровень ИЛ-10, наоборот, прогрессивно снижался до следовых показателей. Полученные нами данные свидетельствуют о развитии у больных с выраженным иммунным воспалением в почке дисбаланса повреждающих и защитных механизмов с ослаблением его противовоспалительного компонента.

Для оценки иммунорегуляторной функции БТШ мы также изучили содержание в сыворотке крови циркулирующих АТ к БТШ-70. Их уровень у больных с активным ХГН (как с мочевым, так и с НС) был значимо выше, чем у пациентов с латентным течением заболевания. Вместе с тем, при высокоактивном течении заболевания, характеризующимся сочетанием тяжелого НС с преходящим нарушением функции почек, мы выявили достоверное снижение уровня АТ к БТШ-70 в сыворотке крови.

Патогенетическое значение и прогностическая роль АТ к БТШ-70 при иммунной патологии изучены пока еще недостаточно. Имеются ряд исследований, демонстрирующих увеличение титра АТ к БТШ, в том числе к БТШ-70, при иммуновоспалительных и аутоиммунных заболеваниях (системной красной волчанке, ревматоидном артрите, васкулитах, дерматомиозите и др.) [23]. Н.А. Мухин и соавт. показали увеличение уровня АТ к БТШ-70 в сыворотке крови у больных с ХГН и амилоидозом с НС [24]. В нескольких исследованиях подтверждено значение уровня АТ к БТШ-70 в сыворотке крови как предикторов неблагоприятного прогноза у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и атеросклерозом. Так, X. Zhanq и соавт. показали, что высокое содержание БТШ-70 в сыворотке крови в сочетании с низким титром АТ к БТШ-70 ассоциировано с высоким риском прогрессирования атеросклероза и сердечно-сосудистых осложнений в популяции [25]. По данным E. Dulin и соавт., снижение уровня циркулирующих АТ к БТШ имеет неблагоприятное прогностическое значение при ишемической болезни сердца [26].

В нашем исследовании снижение уровня АТ к БТШ-70 в сыворотке крови у пациентов с тяжелым течением ХГН коррелировало с уменьшением количества Т-регуляторных FoxP3⁺ клеток в ткани почки и низким уровнем ИЛ-10 в моче. В этом случае заболевание характеризовалось торпидным течением, несмотря на длительное лечение различными иммуносупрессивными препаратами. Снижение уровня АТ к БТШ-70 у этой группы пациентов может косвенно отражать недостаточность иммунорегуляторных эффектов БТШ-70 со снижением количества БТШ-специфичных Т-регуляторных клеток и общей противовоспалительной активности.

Комплексный анализ изменений всех изученных мочевых и сывороточных тестов на разных этапах течения ХГН показал, что при нарастании активности заболевания (прежде всего, увеличении ПУ) в ответ на активацию факторов повреждения (увеличение уровня в моче воспалительного ИЛ-6) наблюдаются адаптивные изменения в системе самозащиты почки – усиленная экскреция с мочой БТШ-27 и БТШ-70, рост уровня в моче противовоспалительного ИЛ-10, а в сыворотке крови – АТ к БТШ-70 (как отражение активации внутри- и внеклеточных защитных эффектов БТШ). При прогрессирующем течении ХГН (развитии НС, усугублении степени его тяжести, особенно в сочетании с нарушением функции почек) баланс повреждающих и защитных механизмов наруша-

ется: при продолжающемся росте уровня ИЛ-6 в моче и увеличении экскреции с мочой БТШ-27 и БТШ-70 наблюдаются резкое снижение уровня ИЛ-10 в моче (вплоть до неопределяемых значений) и уменьшение АТ к БТШ-70 в сыворотке крови, что отражает ослабление иммунорегуляторных и противовоспалительных эффектов БТШ. Такой спектр биомаркеров указывает на риск дальнейшего прогрессирования воспалительных изменений в почке и худший ответ на лечение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования подтверждена возможность оценки механизмов «самозащиты» почки с помощью изучения одного из ее звеньев – белков теплового шока. Тесные корреляции изученных мочевых и сывороточных показателей БТШ с клиническими и морфологическими признаками активности ХГН позволяют использовать эти биомаркеры для мониторингирования процессов повреждения в почке и прогнозировать течение ХГН, что важно для определения тактики лечения больных на каждом этапе течения заболевания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kitamura N, Fine LG The concept of glomerular self-defense. *Kidney Int* 1999; 55: 1639-1671
2. Бобкова ИН, Чеботарева НВ, Козловская ЛВ, Непринцева НВ. Система самозащиты почки: современный взгляд на механизмы, определяющие течение и исход гломерулонефрита. *Нефрология и диализ* 2013; 15(3): 174-183 [Bobkova IN, Chebotareva NV, Kozlovskaja LV, Neprintceva NV. Sistema samozashchity' pochki: sovremenny'i vzglyad na mehanizmy', opredeljaiushchie techenie i ishod glomerulonefrita. *Nefrologiia i dializ* 2013; 15(3): 174-183]
3. Бобкова ИН, Чеботарева НВ, Козловская ЛВ, Непринцева НВ. Защитное действие белков теплового шока при заболеваниях почек. *Клин нефрол* 2011; 6: 59 -66 [Bobkova IN, Chebotareva NV, Kozlovskaja LV, Neprintceva NV. Zashchitnoe dei'stvie belkov teplovogo shoka pri zabolevaniiah почек. *Clinicheskaja nefrologiia* 2011; 6: 59 -66]
4. Welch WJ. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implication for medicine and disease. *Physiol Rev* 1992; 72: 1063-1081
5. Komatsuda A, Wakui H, Imai H et al. Renal localization of the constitutive 73-kDa heat-shock protein in normal and PAN rats. *Kidney Int* 1992; 41: 1204-1212
6. Tsagalis GC, Nikolopoulou N, Sotsiou F et al. The Expression of heat shock proteins 27 and 70 in lupus nephritis. *Hospital Chronicles* 2006; 1(3): 125-129
7. Venkateshan VS, Marquet E. Heat shock protein 72/73 in normal and diseased kidneys. *Nephron* 1996; 73:442-449
8. Ивашкин ВТ, Драпкина ОМ. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. ГЭОТАР-Медиа, М., 2011 [Ivashkin VT, Drapkina OM. Clinicheskoe znachenie oksida azota i belkov teplovogo shoka. GEOTAR-Media, M., 2011]
9. Панасенко ОО, Ким МВ, Гусев НБ. Структура и свойства малых белков теплового шока. *Успехи биологической химии* 2003; 43: 59-98 [Panashenko OO, Kim MV, Gusev NB. Struktura i svoi'stva mal'y'kh belkov teplovogo shoka. *Uspеhi biologicheskoi himii* 2003; 43: 59-98]

10. Mehlen P, Hickey E, Weber LA et al. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generated a protection against TNF α Preville X, Schultz H, Knauf U et al. Analysis of the role of Hsp27 phosphorylation reveals the importance of the oligomerization state of this small heat shock protein in its protective function against TNF- α Smoyer WE, Gupta A, Mundel P et al. Altered expression of glomerular heat shock protein 27 in experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1996; 97: 2697-2704
11. Preville X, Schultz H, Knauf U et al. Analysis of the role of Hsp27 phosphorylation reveals the importance of the oligomerization state of this small heat shock protein in its protective function against TNF- α and hydrogen peroxide-induced cell death. *J Cell Biochem* 1998; 69: 436-452
12. Smoyer WE, Gupta A, Mundel P et al. Altered expression of glomerular heat shock protein 27 in experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1996; 97: 2697-2704
13. Чеботарева НВ, Непринцева НВ, Еськова ОА и др. Определение уровня в моче маркеров повреждения и факторов самозащиты подоцитов у больных хроническим гломерулонефритом. *Клин нефрол* 2013; 4: 33-37 [Chebotareva NV, Neprintceva NV, Es'kova OA i dr. Opredelenie urovnia v moche markerov povrezhdeniia i faktorov samozashchity` podotcitov u bol'ny'kh khronicheskim glomerulonefritom. *Clinicheskaiia nefrologiia* 2013; 4: 33-37]
14. Morita K, Wakui H, Komatsuda A et al. Induction of heat-shock proteins HSP73 and HSP90 in rat kidneys after ischemia. *Ren Fail* 1995; 17: 405-419
15. Komatsuda G, Wakui H, Satoh K et al. Altered localization of 73-kilodalton heat-shock protein in rat kidneys with gentamicin-induced acute tubular injury. *Lab Invest* 1993; 68: 687-695
16. Aufrecht C, Lu E, Thulin G et al. ATP releases HSP72 from protein aggregates after renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998; 274: 268-274
17. Mueller T, Bidmon B, Pichler P et al. Urinary heat shock protein-72 excretion in clinical and experimental renal ischemia. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 97-99
18. Dodd SM, Martin JE, Swash M et al. Expression of heat shock protein epitopes in renal disease. *Clinical Nephrology* 1993; 39(5): 239-244
19. Van Eden W, Tholet JER, van der Zee R et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocyte in adjuvant arthritis. *Nature* 1988; 331: 171-173
20. Multhoff G, Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 167-176
21. Anderton SM, van der Zee R, Prakken B et al. Activation of T cells recognizing self 60-kDa heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J Exp Med* 1995; 181: 943-952
22. Marzec L, Zdrojewski Z, Liberek T et al. Expression of Hsp 72 protein in chronic kidney disease patients. *Scandinavian J Urol and Nephrol* 2009; 43(5): 400-408
23. Wu T, Tanguay RM. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? *Cell Stress and Chaperones* 2006; 11(1): 1-12
24. Мухин НА, Ляшко ВН, Маргулис БА и др. Амилоидоз и антитела к белкам теплового шока. *Терапевт арх* 1992; 64; 79-82 [Muhin NA, Liashko VN, Margulis BA i dr. Amiloidoz i antitela k belkam teplovogo shoka. *Terapevticheskii` arhiv* 1992; 64; 79-82]
25. Zhang X, Xu Z, Zhou L et al. Plasma levels of Hsp 70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of coronary syndrome. *Cell Stress and Chaperones* 2010; 15: 675-686
26. Dulin E, Barreno PG, Guisasaola MC. Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in a general population. *Cell Stress and Chaperones* 2010; 15: 929-937

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 12.09.2014 г.

Принята в печать: 14.01.2015 г.