

На правах рукописи

КУСТОВА
ТАТЬЯНА ЮРЬЕВНА

"Значение определения циркулирующего натрийуретического пропептида (pro ANP) и его локально-почечного мессенджера (сGMP) в оценке активности и прогноза хронического гломерулонефрита"

14.01.29-нефрология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2016

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Лысенко Лидия Владимировна

Официальные оппоненты:

Прокопенко Елена Ивановна доктор медицинских наук, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт имени М.Ф.Владимирского, кафедра трансплантологии, нефрологии и искусственных органов ФУВ, профессор кафедры.

Ермоленко Валентин Михайлович доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последиplomного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра нефрологии и гемодиализа, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2016 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.040.05 при ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (119991, Москва, Трубецкая ул., д.8, стр.2).

С диссертацией можно ознакомиться в научном отделе библиотеки Первого МГМУ имени И.М.Сеченова по адресу: 119034, Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте Первого МГМУ им. И.М.Сеченова www.mma.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета
Кандидат медицинских наук, доцент

Брагина Анна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Нефротический синдром (НС) является частым и характерным проявлением хронического гломерулонефрита (ХГН), особенно его протеинурических форм (фокально-сегментарный гломерулосклероз, мембранозная нефропатия, болезнь минимальных изменений) и по-прежнему рассматривается как клинический эквивалент активности заболевания (Н.А.Мухин, Л.В.Козловская с соавт,2009г, Raij L et al,1995). В настоящее время интенсивно ведутся поиски новых высоко специфичных медиаторов, появление которых в сыворотке крови/моче и изменение их концентраций коррелирует с клинико-лабораторными показателями активности ХГН и отражают лежащие в ее основе локально-почечные механизмы.

Так, система натрийуретических пептидов, долгое время представлявшая интерес главным образом с точки зрения участия в генезе сердечной недостаточности, в настоящее время приобретает значение и в области нефрологии (Ю.В.Наточин с соавт,2002г). Многие экспериментальные исследования и исследования, проведенные в клинических условиях (J. Plum et al,1996, Knight S et al, 2007, Sabrane K et al,2005), подтверждают важную роль натрийуретических пептидов, в частности предсердного натрийуретического пептида (ANP), в функционировании канальцевых транспортных систем почек а также в развитии НС при ХГН.

Биологические эффекты ANP в почке реализуются через различные механизмы, основное место среди них занимает cGMP - вторичный мессенджер ANP, в тесной связи с которым происходит превращение предшественника гормона (pro ANP) в активный ANP (Correa et al, 2007); активный ANP, в свою очередь, участвует в образовании cGMP.

Опосредованно через взаимодействие с cGMP активированный ANP оказывает влияние на подоциты, изменяет внутригломерулярное давление и объем фильтрационного пространства в почке, увеличивая СКФ (Wolf G et al,2005). Кроме того, воздействие ANP/cGMP на подоциты осуществляется путем поддержания формы и структуры цитоскелета подоцита (Knight S et al,2007), повышения экспрессии подоцитарных регуляторных белков - нефрина, подоцина и других (Cátia Fernandes-Cerqueira et al,2013).

Нарушение синтеза компонентов системы ANP/cGMP при ХГН является одним из механизмов формирования НС и проявления его патологических эффектов на почку (Vockenhauer D et al,2011). Исходя из этого, многосторонняя характеристика НС, не только клиническая, морфологическая, но и эндокринно-функциональная, имеет важное значение для оптимизации подходов к определению активности ХГН, включая его протеинурические формы, разработки

и внедрения новых протоколов мониторингования течения заболевания на всех его стадиях.

Молекула ANP *in vivo* в отличие от прогормона (pro ANP) обладает значительно более коротким периодом полужизни и труднодоступна для исследования (Brenner BM et al,1990), поэтому в клинических условиях обычно изучают уровень в плазме крови pro ANP.

Цель исследования

У больных протеинурическими формами хронического гломерулонефрита (ХГН) оценить значение определения в плазме крови прогормона предсердного натрийуретического пептида (pro ANP) и содержание в моче вторичного мессенджера его активной формы – циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) как критериев активности и прогноза заболевания

Задачи исследования:

1. Изучить характер изменения плазменного уровня прогормона предсердного натрийуретического пептида - pro ANP у больных протеинурическими формами ХГН.
2. Определить уровень экскреции с мочой больных протеинурическими формами ХГН вторичного мессенджера ANP - сGMP.
3. Охарактеризовать степень изменения изученных показателей системы pro ANP/сGMP в зависимости от ведущего клинического синдрома поражения почек и определить возможность их использования для мониторингования активности ХГН.
4. Оценить значение исследования плазменного уровня pro ANP и величины экскреции с мочой сGMP, чувствительность и специфичность этих тестов как предикторов прогноза течения протеинурических форм ХГН.

Научная новизна

Впервые в клинических условиях у больных с протеинурическими формами ХГН изучены характер и степень изменения циркулирующей формы предсердного натрийуретического пептида – прогормона ANP (pro ANP) как более устойчивой молекулы ANP, а также экскреции с мочой его локально-почечного мессенджера-циклического гуанозинмонофосфата (сGMP). Нами была отмечена связь степени повышения плазменного уровня pro ANP и снижения экскреции с мочой сGMP, с активностью и прогрессированием ХГН. У больных активными протеинурическими формами ХГН высокий уровень pro ANP в плазме крови прямо коррелирует со степенью почечной дисфункции и является предиктором ее дальнейшего ухудшения, а низкая концентрация сGMP - с выраженностью

белковых сдвигов в сыворотке крови и протеинурией, отражая тяжесть НС и предсказывая вероятность его длительной персистенции.

Впервые на основании полученных результатов, с использованием в том числе и неинвазивного подхода (исследование мочи), удалось разработать метод определения активности и прогрессирования ХГН, обладающий высокой степенью специфичности и чувствительности, и при помощи количественной оценки изученных этих биомаркеров оценить дальнейший прогноз течения ХГН у больных.

Практическая значимость

Проведенная в настоящем исследовании оценка динамики изменения плазменного уровня pro ANP и экскреции с мочой cGMP у больных протеинурическими формами ХГН в зависимости от стадии заболевания позволила выделить новые диагностические биомаркеры, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью, и таким образом, оптимизировать подходы к определению активности и прогрессирования ХГН.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У больных протеинурическими формами ХГН в отличие от здоровых лиц выявляются изменения уровня в плазме крови прогормона - pro ANP, и экскреции с мочой вторичного мессенджера ANP - cGMP, характер и степень которых зависят от особенностей клинического течения ХГН.
2. Наиболее высокий плазменный уровень pro ANP и низкий уровень экскреции cGMP наблюдаются у больных активным нефритом с НС, особенно с почечной дисфункцией, что подтверждает роль этих биомаркеров в реализации повреждения почек при ХГН и возможность использования их для оценки активности/тяжести течения заболевания.
3. Оценка компонентов системы pro ANP - cGMP имеет прогностическое значение при ХГН: высокий плазменный уровень pro ANP у больных протеинурическими формами ХГН с исходно нормальной функцией почек является предиктором развития почечной недостаточности, а у больных с почечной дисфункцией - ее дальнейшего прогрессирования; низкий уровень мочевого экскреции cGMP с высокой степенью доказательности позволяет предсказать персистенцию (рефрактерный характер) нефротического синдрома.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты исследования используются в работе нефрологического отделения УКБ№3 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, в учебном процессе на кафедре внутренних, профессиональных заболеваний и пульмонологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, кафедре нефрологии и гемодиализа ИПО Первого МГМУ им. И.М.Сеченова

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатных работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Апробация работы

Апробация работы состоялась 22 января 2015 г. на заседании кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии МПФ, ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова.

Личный вклад автора

Автором лично проведены планирование работы, поиск и анализ литературы по теме диссертации, набор пациентов, клиническое обследование больных, формирование базы данных, статистическая обработка, обобщение и анализ полученных результатов. Автором освоены методика определения предсердного натрийуретического пептида в сыворотке крови и его вторичного мессенджера в моче методом ELISA. Автор непосредственно участвовал во всех этапах исследования от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и внедрения в практику.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.29 - "нефрология". Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно - пунктам 2,4,6 и 11 паспорта нефрологии.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 100 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственного исследования, их обсуждения, выводов и практических рекомендаций, 14 таблиц и диаграмм. Список литературы содержит 200 источников, из них 40 отечественных.

База проведения исследования

Клиническое исследование проводилось на базе кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии медико-профилактического факультета ПМГМУ им И.М.Сеченова в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М.Тареева (заведующий кафедрой и директор клиники – академик РАН, д.м.н., профессор Н.А.Мухин), УКБ№3 (главный врач

к.м.н. В.В.Панасюк). Выражаю большую благодарность всем сотрудникам кафедры и клиники за содействие в проведении работы.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

1. Характеристика больных

Согласно цели и задачам исследования нами обследовано 60 больных хроническим гломерулонефритом (ХГН): 22 женщины и 38 мужчин, в возрасте от 17 до 62 лет ($38 \pm 13,96$ лет), наблюдавшихся в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е. М. Тареева с 2011 по 2013г. Изучены четыре группы больных ХГН, различающихся по степени активности заболевания.

В группу I вошли 18 больных с нефротическим синдромом в сочетании с почечной дисфункцией как проявлением высокой активности заболевания. Группу II составили 16 больных активным нефритом с НС и нормальной функцией почек.

Группа III представлена 15 больными менее активной формой нефрита с персистирующей ПУ субнефротического уровня.

В группу IV включены 11 больных с неактивным ХГН вне обострения. Контрольную группу составили 9 здоровых лиц: 7 женщин и 2 мужчин, в возрасте от 22 до 62 лет ($37 \pm 12,2$ лет).

Среди обследованных больных ХГН диагноз подтвержден морфологически у 37: у большинства (17) гистологическая картина биоптата почки была представлена протеинурическими вариантами - мембранозной нефропатией (9), болезнью минимальных изменений (8) и фокально-сегментарным гломерулосклерозом - ФСГС (11), и у 10 больных выявлялись пролиферативные варианты нефрита - мезангиокапиллярный (3) и мезангиопролиферативный (7).

Критериями исключения из исследования было наличие у больных признаков активной мочевой инфекции, сопутствующего сахарного диабета, тяжелой артериальной гипертонии, избыточной массы тела, вирусных гепатитов, системных заболеваний.

Среди больных ХГН (табл 1), клинически протекающих как протеинурические формы - группа I характеризовалась наиболее высокой активностью - сочетанием почечной недостаточности с НС. Признаки НС у больных были отчетливо выражены: отеки различной степени и локализации, ПУ, достигающая в отдельных случаях 21 г/сут ($9,04 \pm 3,13$ г/сут), выраженная гипоальбуминемия ($23,3 \pm 3,08$ г/л), отмечалась небольшая эритроцитурия (от 10 до 15 в п/зр). Артериальная гипертония была умеренной (САД $158,4 \pm 6$ и ДАД $105,3 \pm 8$ мм.рт.ст.). Почечная недостаточность (креатинин сыворотки $1,7 \pm 0,44$ мг/дл) у всех

больных была признаком активности ХГН. Длительность НС варьировала от 4 мес до 1 года.

Больные группы II по степени выраженности НС были сходны с группой I (ПУ $9,07 \pm 5,2$ г/с), однако почечная функция у всех них сохранна (креатинин сыворотки $0,7 \pm 0,12$ мг/дл). Имелась небольшая ЭУ (от 5 до 10 в п/зр). Артериальное давление колебалось от нормальных значений до умеренного его повышения (САД $135,2 \pm 4$ и ДАД $80,2 \pm 3$ мм.рт.ст.) Длительность нефрита в группе II составила в среднем 2 года, длительность НС к моменту обследования - 6 мес.

У больных группы III наблюдался умеренный мочевого синдром (МС): ПУ субнефротического уровня ($2,08 \pm 0,86$ г/сут). Функция почек также как и в группе II была сохранна. Отмечалась умеренная ЭУ (от 5 до 20 в п/зр). Отсутствовала АГ. Длительность нефрита составила в среднем 1,3 года.

У больных группы IV выявляли ПУ менее 1 г/сут ($0,59 \pm 0,19$), небольшая ЭУ (от 10 до 35 в п/зр), сохранная функция почек. АД в пределах нормальных значений. Длительность ХГН к моменту обследования составила 3 года.

У больных всех исследованных групп не было значимых отклонений уровня натрия в сыворотке крови и экскреции его с мочой.

Таблица 1. Клиническая характеристика исследованных групп больных ХГН ($M \pm m$)

Клинико-лабораторные показатели	Активные клинические формы ХГН			Неактивный ХГН
	Группа I (НС с ПН) N-18	Группа II (НС без ПН) N-16	Группа III (с умеренным МС) N-15	Группа IV N-11
Суточная протеинурия г/сут	$9,04 \pm 3,13$	$9,07 \pm 5,2$	$2,08 \pm 0,86$	$0,59 \pm 0,19$
ЭУ п/зр	10-15	5-10	5-20	10-35
Альбумин сыворотки г/л	$23,3 \pm 3,08$	$23,4 \pm 3,9$	$37,4 \pm 3,5$	$39,4 \pm 3,2$
Общий белок сыворотки г/л	$42,2 \pm 4,6$	$41,4 \pm 4,8$	$58,5 \pm 7,0$	$59,3 \pm 8,0$
Креатинин сыворотки мг/дл	$1,7 \pm 0,44$	$0,7 \pm 0,12$	$0,8 \pm 0,17$	$0,6 \pm 0,13$
Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) (проба Реберга-Тареева) мл/мин	$67,2 \pm 21,0$	$108 \pm 28,9$	$112,4 \pm 31,5$	$107,1 \pm 15,6$
АД сист. мм.рт.ст.	$158,4 \pm 6$	$135,2 \pm 4$	$112,4 \pm 3$	$117,2 \pm 4$
АД диаст. мм.рт.ст.	$105,3 \pm 8$	$80,2 \pm 3$	$76,5 \pm 4$	$78,4 \pm 5$
Экскреция натрия, г/сут	$2,7 \pm 0,37$	$2,59 \pm 0,75$	$2,15 \pm 0,89$	$2,74 \pm 0,43$
Натрий сыворотки, мэкв/л	$146,3 \pm 7$	$143,9 \pm 4,8$	$144,6 \pm 3,27$	$143,6 \pm 3,04$

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

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) определяли по клиренсу эндогенного креатинина (проба Реберга-Тареева) и расчетным методом по формуле СКД-ЕРІ.

Специальные методы исследования

У включенных в исследование больных ХГН и здоровых людей систему натрийуретических пептидов оценивали по двум параметрам: плазменному уровню pro ANP (как более устойчивой молекулы) и мочевой экскреции cGMP. Для исследования уровня pro ANP у больных натошак забирали 5 мл венозной крови в пластиковую пробирку с ЭДТА, затем центрифугировали для отделения плазмы. Полученную плазму до простановки проб хранили в замороженном состоянии при температуре -20С.

Для исследования мочевой экскреции cGMP у больных производили забор 10 мл утренней мочи в сухие пластиковые пробирки и центрифугировали (при 1500 об/мин) в течение 5 минут при комнатной температуре с целью удаления клеток мочевого осадка, затем забирали надосадочный слой мочи, который до исследования замораживали при температуре -20С.

Исследование обоих биомаркеров выполняли методом иммуноферментной реакции с использованием реактивов фирмы «Enzo» США.

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

У больных, поступивших в стационар с обострением ХГН, исследование выполняли до начала активной иммуносупрессивной терапии, либо при продолжении ранее назначенной терапии до повышения ее дозы.

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

Методы статистической обработки

Для статистического анализа полученных данных был использован пакет прикладных программ STATISTICA 6,0 и SPSS 11.5. На основании критериев Шапиро-Вилка и χ^2 Пирсона было оценено нормальное распределение исследуемых показателей. При сравнении параметров, имевших ненормальное распределение, использовали критерий Манна-Уитни или критерий Крускала-Уоллиса. Определяли медиану, разброс величин по отношению к медиане по показателю интерквартильного размаха (25%, 75% процентиля). В тексте работы

все значения представлены в виде медианы, в фигурных скобках указан интерквартильный размах. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости для всех статистических данных принимали равным 0,05.

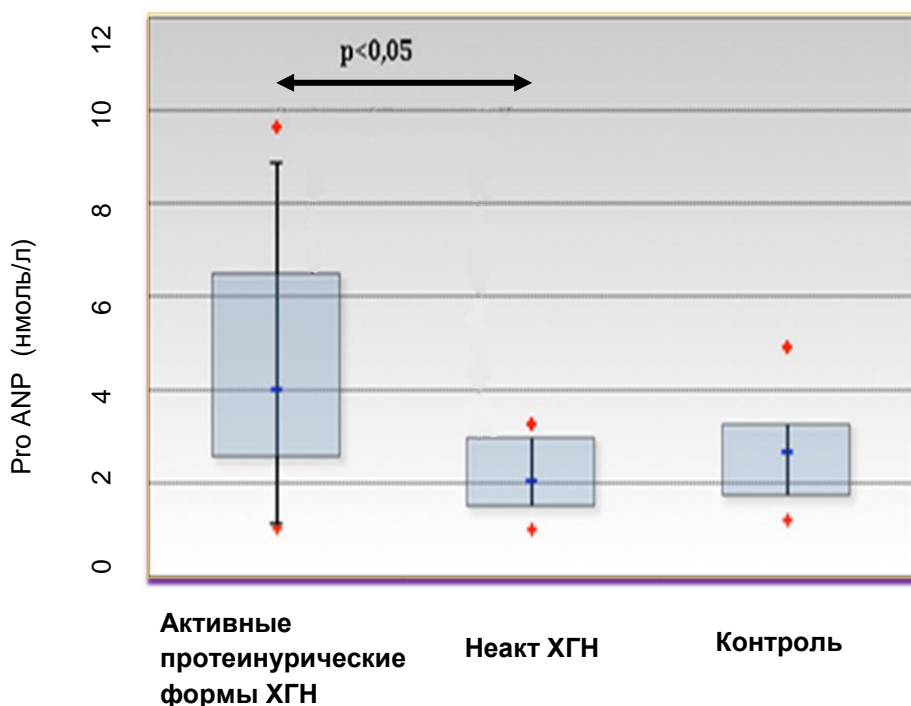
Результаты исследования и их обсуждение

1. Уровень pro ANP в плазме крови больных ХГН

Уровень pro ANP в плазме крови больных ХГН (n=60) оказался выше (3,09 {2,08-5,32} нмоль/л), чем у здоровых лиц (2,67 {1,95-3,24} нмоль/л) однако разница между группами не достигла статистической значимости ($p>0,05$), из-за разброса индивидуальных показателей в группе больных ХГН.

Величина плазменного показателя proANP зависела от клинической активности ХГН: у больных активными формами (группы I,II,III) он был достоверно (в среднем в 2 раза) выше, чем у больных ХГН вне обострения (группа IV) и контролем (соответственно 4 {2,56-6,49}, 2,04 {1,51-2,97} и 2,67 {1,95-3,24} нмоль/л, $p<0,05$), между больными вне обострения ХГН (группа IV) и здоровыми людьми (группа контроля) существенной разницы не отмечено ($p>0,05$), рис. 1.

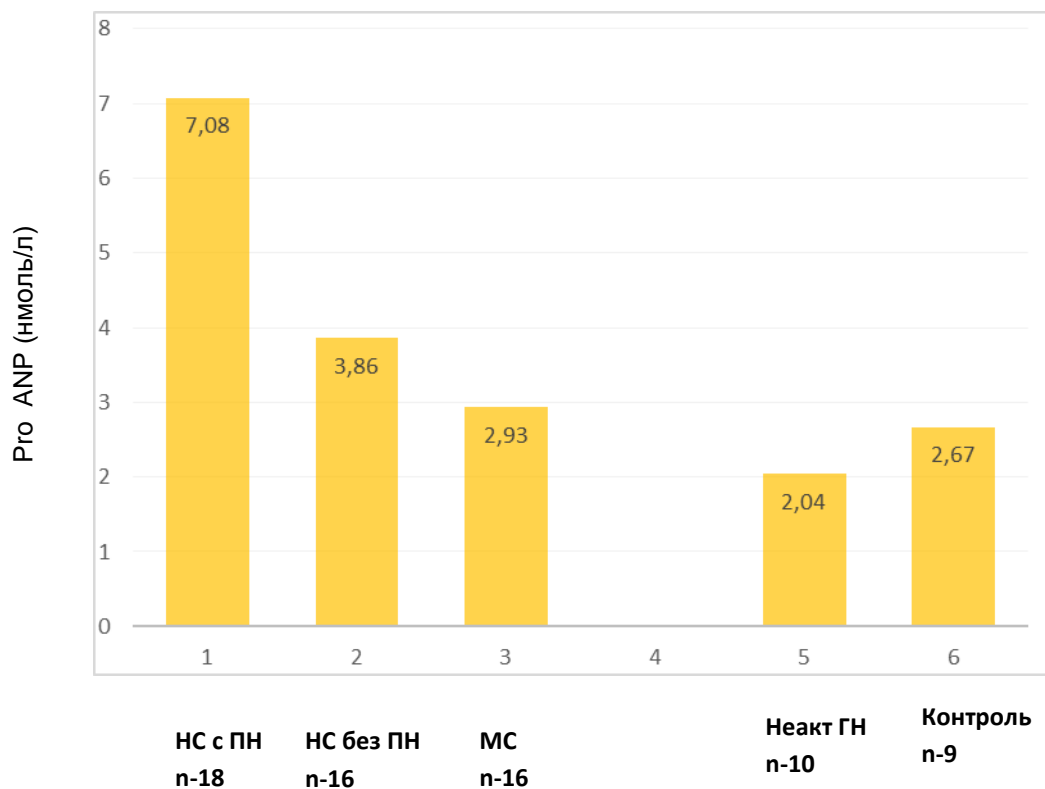
Рисунок 1. Уровень pro ANP в плазме крови больных активными протеинурическими формами ХГН (n=50), неактивной формой ХГН (n=10) и контролем (n=9).



Среди больных клинически активными протеинурическими формами ХГН плазменный уровень pro ANP был выше у больных с наличием НС (3,86 {1,91-4,81} нмоль/л), чем у больных с умеренным МС (2,93 {1,94-5,3} нмоль/л, $p<0,05$). Самый высокий средний уровень прогормона выявлен у больных с НС и почечной дисфункцией, то есть с наиболее активной формой ХГН (7,08 {4,28-8,67} нмоль/л,

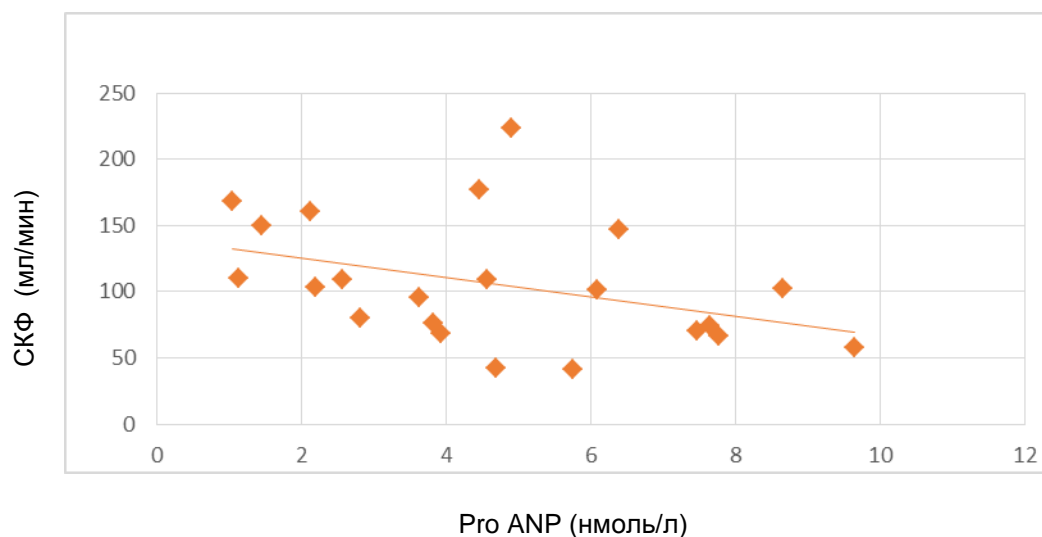
$p < 0,05$). Именно в этой группе больных мы отметили максимальные в нашем наблюдении индивидуальные показатели proANP, достигавшие в отдельных случаях значения 9,64 нмоль/л, тогда как например в IV группе больных (вне обострения) наиболее высокий показатель плазменного уровня pro ANP не превышал 3 нмоль/л, то есть был в три раза ниже, чем в группе I, рис 2.

Рисунок 2. Уровень pro ANP в плазме крови больных активными протеинурическими формами ХГН в сравнении с неактивным ХГН и контролем.



Нами установлена достоверная обратная корреляция между уровнем proANP в плазме крови больных ХГН и показателем СКФ, что с нашей точки зрения подтверждает связь между повышением плазменного уровня proANP и активностью/тяжестью ХГН ($R_s = -0,48$; $p < 0,05$), рис. 3.

Рисунок 3. Корреляция между уровнем pro ANP в плазме крови и показателем СКФ у больных протеинурическими формами ХГН (n- 50).



На основании результатов корреляционного анализа в группе больных активными протеинурическими формами ХГН мы провели многофакторный регрессионный анализ. Нами не было отмечено влияния на уровень pro ANP в плазме крови таких клинических симптомов как САД (Beta 0,04, p-0,32), суточная ПУ (Beta 0,45, p-0,22), альбумина (Beta - 0,058, p-0,87) и экскреции натрия (Beta 0,21, p-0,3), но подтверждена сильная обратная связь между сывороточным уровнем pro ANP и величиной СКФ (Beta - 0,05, p-0,04).

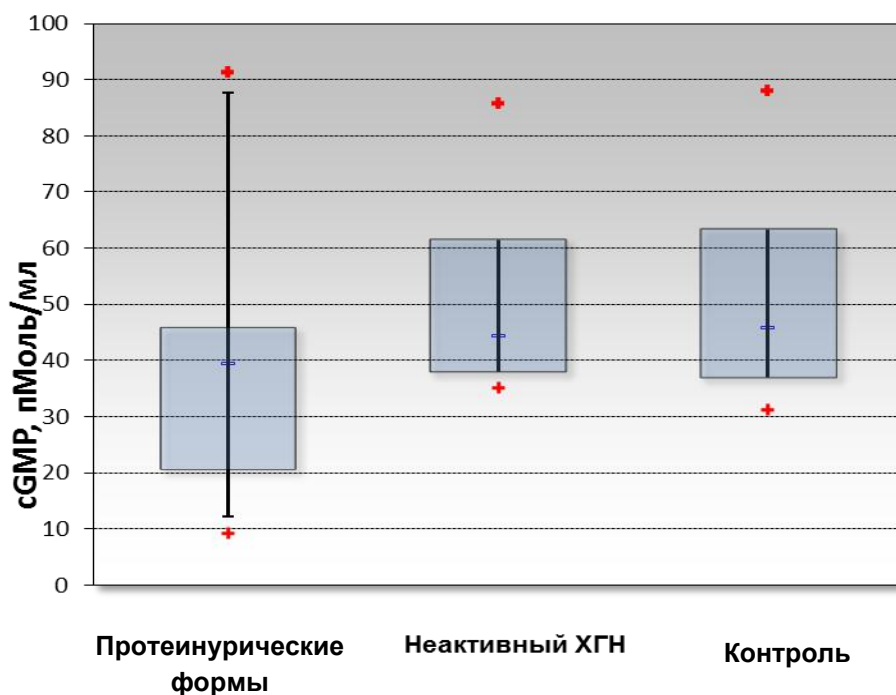
Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе данными. Показано, что в процессе развития иммунного воспаления в почке при экспериментальном НС (Sabrane K et al, 2005, Wolf G et al,2003) нарушается превращение proANP в ANP, происходит накопление функционально неактивного pro ANP и как следствие - редукция совокупной фильтрационной поверхности и формирование почечной недостаточности (Tang KM et al,2003, Wolf G et al,2005). В последние годы этому механизму стали придавать значение и в реализации нефротоксических эффектов ПУ (Kuno Y et al, 2011).

2. Уровень экскреции cGMP с мочой больных ХГН

Наряду с увеличением плазменного уровня прогормона предсердного натрийуретического пептида (pro ANP) нами выявлено у больных ХГН (n-60) снижение экскреции с мочой его вторичного мессенджера - cGMP. Несмотря на то, что уровень мочевого экскреции cGMP у больных ХГН в целом был ниже (40,72 {29,35-46,6} пмоль/мл), чем в контрольной группе (45,91 {39,25-57,89} пмоль/мл), эта разница как и при анализе ANP была статистически не достоверна (p>0,05).

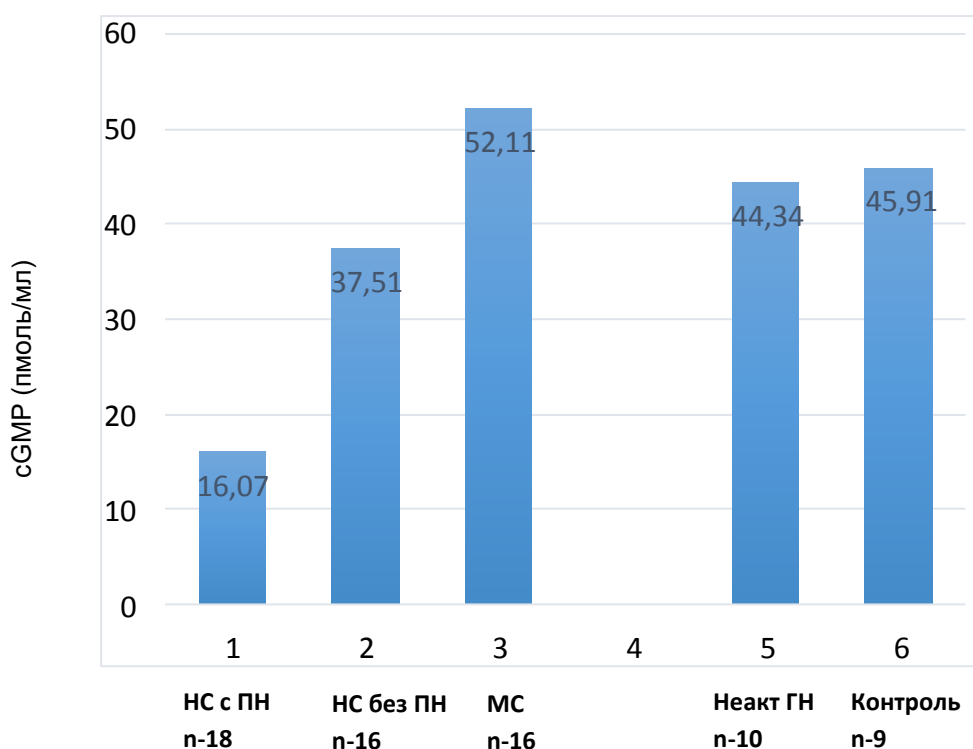
Также как при изучении плазменного уровня pro ANP, имелась зависимость степени снижения экскреции cGMP с мочой больных от активности ХГН. У больных активными протеинурическими формами ХГН (гр I,II,III) уровень экскреции cGMP был более низким (39,47 {20,79-45,74} пмоль/мл) по сравнению с больными вне обострения (группа IV) и контролем (соответственно 44,34 {37,96-61,46} и 45,91 {39,25-57,89} пмоль/мл, p>0,05), рис. 4.

Рисунок 4. Экскреция сGMP с мочой больных активными протеинурическими формами ХГН (n-50), неактивным ХГН (n-10) и здоровыми лицами (n-9).



У больных активным ХГН с НС (гр I и II) этот показатель был ниже (соответственно 16,07 {13,09-40,28} и 37,51 {21,73-44,53} пмоль/мл) по сравнению с больными менее активной формой нефрита (гр III), протекающего с умеренным МС (52,11 {38,78-78,05} пмоль/мл, $p < 0,05$ и $p < 0,05$). Самый низкий уровень экскреции сGMP в нашем наблюдении отмечен в группе больных с сочетанием НС и почечной дисфункции, рис. 5.

Рисунок 5. Уровень экскреции сGMP с мочой больных активными протеинурическими формами ХГН в сравнении с группой больных неактивным ХГН и контролем.



Связь низкой мочевой экскреции сGMP у больных ХГН с высокой активностью заболевания подтверждена выявленной нами сильной обратной корреляцией с величиной суточной протеинурии ($R=0,42, p<0,05$) и прямой корреляцией между этим показателем и уровнем сывороточного альбумина ($R=0,51, p<0,01$).

Рисунки 6. Связь экскреции сGMP у больных протеинурическими формами ХГН с величиной СПУ (а) и уровнем сывороточного альбумина (б), n=50.

Рисунок 6а

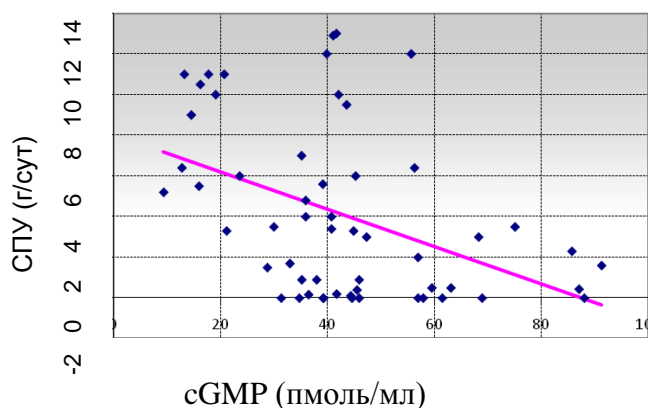
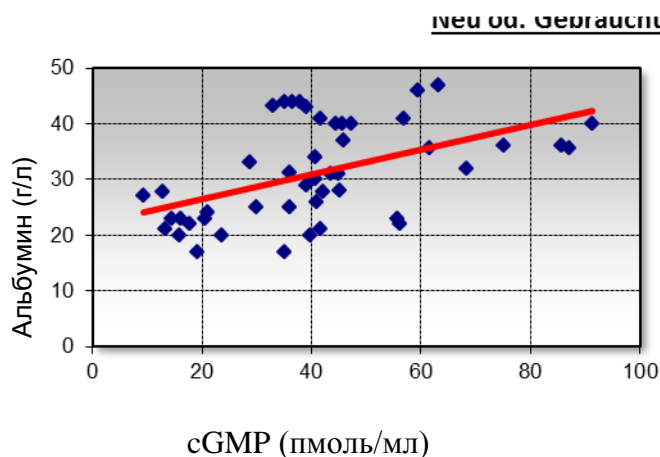


Рисунок 6б



В результате проведенного многофакторного регрессионного анализа в той же группе больных активными протеинурическими формами ХГН, нами не выявлено связи величины экскреции сGMP с САД (Beta 0,02, $p=0,43$), СКФ (Beta -0,1, $p=0,62$), экскрецией натрия (Beta 0,04, $p=0,56$), но отмечена связь экскреции сGMP с белковыми показателями крови и мочи, в первую очередь сильная прямая связь с уровнем альбумина сыворотки крови (Beta 0,85, $p=0,043$), как было выявлено и при корреляционном анализе, рис. 6б.

Полученные нами данные можно объяснить с точки зрения соотношения уровня экскреции сGMP, как вторичного мессенджера ANP, с концентрацией активной формы ANP (чем ниже уровень ANP, тем ниже продукция его вторичного мессенджера-сGMP) (Bockenhauer D et al, 2011), а также через установленную в эксперименте способность сGMP участвовать в поддержании структуры цитоскелета подоцита, предотвращая его распластывание (Zhao HJ et al, 2006). При снижении содержания в почке NO (в результате его потребления в процессах свободного радикального окисления или вследствие накопления эндогенной NO-синтазы при потере массы функционирующей почечной паренхимы) нарушаются синтез сGMP в подоците (Rodriguez-Iturbe B et al, 2005), его участие в экспрессии подоцитарных белков -нефрина и подоцина, ведущее к потере структурно-функциональной организации подоцита с усилением ПУ (Jefferson JA et al, 2008).

3. Прогностическое значение определения уровня pro ANP в плазме крови и экскреции с мочой cGMP у больных активными протеинурическими формами ХГН.

Учитывая выявленную нами в результате корреляционного и многофакторного регрессионного анализов достоверную связь сывороточного уровня pro ANP с величиной СКФ, мы оценили у больных протеинурическими формами ХГН прогноз течения заболевания в зависимости от исходного уровня этого прогормона, приняв за основу критерий ухудшения функции почек (снижение СКФ).

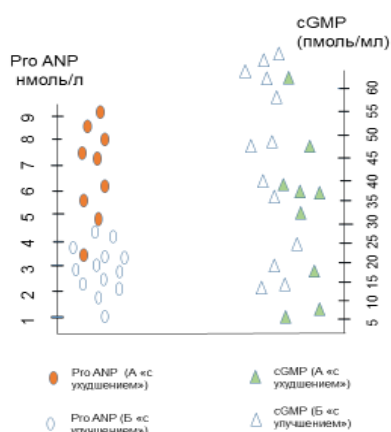
Среди 60 больных ХГН нами были отобраны 23 больных активными протеинурическими формами ХГН, получавших примерно одинаковую стандартную медикаментозную терапию, у которых можно было проследить состояние почечной функции в последующие 1-1,5 года.

Среди 23 прослеженных в динамике больных исходная величина СКФ составляла от 84 до 60 мл/мин, из них у 8 отмечено ухудшение – прогрессирование ХГН (подгруппа А) со снижением СКФ в среднем в 1,5 раза (у 2 больных исходно с ХБП 1 стадии произошло прогрессирование до ХБП 2 и 3А стадии, у 3 больных с ХБП 2 стадии до ХБП 3А стадии и у 3 больных с ХБП 2 стадии до ХБП 4 стадии, при сохраняющейся протеинурии нефротического/субнефротического уровня). У 14 больных отмечено улучшение состояния (подгруппа Б) - сохранение исходно нормальной СКФ или повышение исходно сниженной СКФ более чем на 25% при одновременном уменьшении величины СПУ (более чем на 50% от первоначальной) и нормализации белковых показателей крови. При этом по среднему показателю исходной СКФ различий между этими двумя подгруппами больных не было.

Проведенный анализ показал, что у больных подгруппы А («с ухудшением» почечной функции) исходный уровень pro ANP в среднем был достоверно выше 6,69 [4,08-8,43], чем в подгруппе Б «с улучшением» 2,97 [2,11-3,77] нмоль/л). Сравнение распределения индивидуальных показателей изученных биомаркеров в зависимости от прогноза (подгруппы А и Б) подтвердил эти данные: большинство – 7 из 8 пациентов подгруппы А с прогрессированием почечной дисфункции находились в зоне больших значений pro ANP (от 4 до 9 нмоль/л), тогда как практически все больные с сохранной почечной функцией или с улучшением СКФ располагались в зоне меньших значений proANP (рисунок 7 а,б). В то же время по второму показателю cGMP обе подгруппы достоверно не различались.

Рисунок 7. Распределение индивидуальных показателей а) и средние значения б) изученных биомаркеров в разных по прогнозу группах больных активными протеинурическими формами ХГН, оцененного по динамике СКФ через 1-1,5 года наблюдения (n-23).

а)

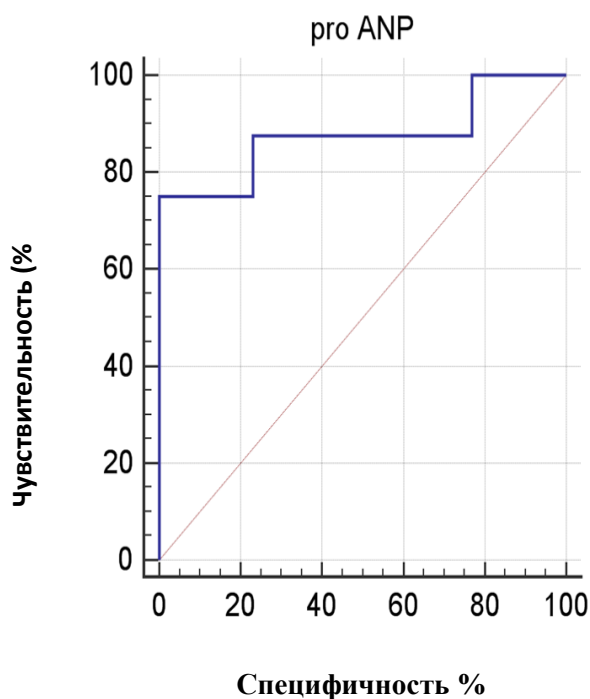


б)

	Подгр А «с ухудшением» (СКФ), n-9	Подгр Б «с улучшением» (СКФ), n-14
pro-ANP (нмоль/л)	6,69 [4,08-8,43] p<0,05	2,97 [2,11-3,77]
cGMP (пмоль/мл)	35,14 [15,36-41,19] p>0,05	42,67 [22,1-61,87]

Для оценки значения плазменного уровня proANP как фактора прогноза нарастания почечной дисфункции нами была построена ROC-кривая (рис. 8).

Рисунок 8. ROC-кривая оценки прогностического значения плазменного уровня proANP (n-23)



Pro ANP (пмоль/л)	> 4,68	>3	>2,67
Чувствительность %	75	77	77
Специфичность %	100	22	20

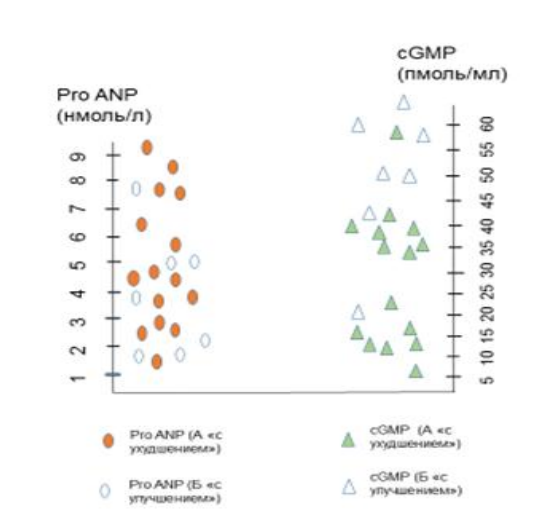
Площадь под кривой (AUC), составила 0,770. Согласно данным ROC-кривой значения плазменного уровня pro-ANP более 4,68 пмоль/л у пациентов с ХГН

свидетельствуют с чувствительностью 75 % и специфичностью 100% о неблагоприятном прогнозе течения - прогрессировании ХБП.

На основании результатов корреляционного и многофакторного регрессионного анализов о связи низкого уровня мочевого экскреции сGMP у больных активными протеинурическими формами ХГН преимущественно с выраженностью белковой дискразии сыворотки крови, мы оценили значение определения этого мочевого биомаркера как фактора риска персистирования (рефрактерности течения) НС. Для этого мы сравнили две подгруппы больных, достоверно не различавшихся по исходному уровню суточной ПУ, через 1-1,5 года наблюдения. У больных подгруппы А (n-15) с сохранением первоначально высокой ПУ, которая нами была обозначена условно как подгруппа А «с ухудшением», уровень экскреции сGMP был в среднем в 1,5 раза ниже, чем у больных подгруппы Б (n-7) «с улучшением», (уменьшение величины СПУ более чем на 50% от первоначальной и нормализацией белковых фракций крови). Анализ распределения больных по индивидуальным показателям изученного биомаркера показал, что 6 из 7 больных «с улучшением» располагались в зоне высоких значений, все больные, кроме одного, из группы «с ухудшением» распределились в зоне более низких и очень низких значений мочевого экскреции сGMP, рис. 9.

Рисунок 9. Распределение индивидуальных показателей а) и средние значения б) изученных биомаркеров в разных по прогнозу группах больных активными протеинурическими формами ХГН с НС, в зависимости от динамики величины НС через 1-1,5 года наблюдения (n-23).

а)



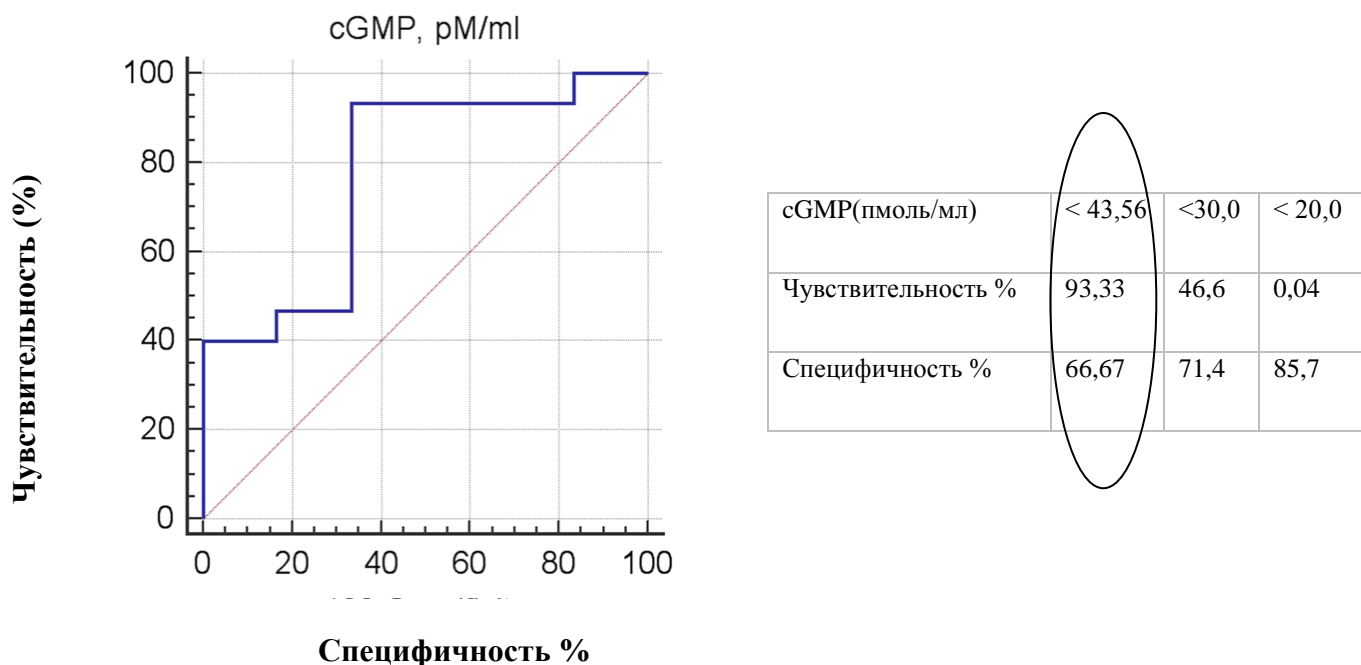
б)

	Подгр А «с ухудшением» (↑СПУ), n-15	Подгр Б «с улучшением» (↓СПУ), n-7
сGMP (пмоль/мл)	35,14 [14,51-39,83]	45,91 [20,68-55,64]
Pro ANP (нмоль/л)	4,68 [2,8-7,47]	3,62 [1,45-4,9]

Нами построена ROC-кривая с целью определения прогностического значения низкого уровня экскреции сGMP как показателя прогноза ХГН по критерию персистенции и рефрактерности НС. Площадь под кривой (AUC) составила 0,724. Согласно ROC-кривой значения сGMP ниже 43 пмоль/мл с чувствительностью 93% и специфичностью 66% позволяют предсказать

персистенцию высокой ПУ у больных активными прогрессирующими формами ХГН (рис 10).

Рисунок 10. ROC оценки прогностического значения мочевого показателя сGMP



Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что для больных протеинурическими формами ХГН с активным прогрессирующим течением, быстрым (за 1-1,5 года) ухудшением почечной функции, характерен изначально высокий плазменный уровень рго ANP, тогда как для больных, у которых показателем сохраняющейся через 1-1,5 года активности ХГН является персистирующий рефрактерный НС, отличительным признаком является исходно низкая экскреция сGMP с мочой.

Заключение.

Результаты исследования позволяют рассматривать изученные нами биомаркеры –плазменный уровень ргоANP и величину экскреции с мочой сGMP как информативные критерии оценки активности и прогноза ХГН. Разработанные нами методы количественной оценки этих показателей с использованием для одного из них (с GMP) неинвазивного подхода (исследование в моче) открывает перспективы их внедрения в практическую врачебную деятельность для мониторинга течения протеинурических форм ХГН, выбора и определения объема патогенетической терапии и оценки ее результатов.

ВЫВОДЫ

1. У больных активными протеинурическими формами ХГН (клинически с ПУ>1 г/сут, у большинства с нефротическим синдромом) выявляются повышенный уровень в плазме крови прогормона предсердного натрийуретического пептида-pro ANP, и сниженная экскреция с мочой вторичного мессенджера ANP-cGMP, у больных неактивной формой ХГН эти показатели не отличаются от уровня у здоровых лиц.
2. Степень изменения плазменного уровня pro ANP и экскреции с мочой cGMP зависят от показателей клинической активности ХГН: у больных активным нефритом с нефротическим синдромом, особенно сопровождающимся почечной дисфункцией, изменения этих биомаркеров более выражены ($p<0,05$), чем у больных с умеренным мочевым синдромом (МС).
3. На основании проведенного корреляционного и линейного регрессионного многофакторного анализов у больных протеинурическими формами ХГН выявляется статистически значимая связь уровня proANP в плазме крови со скоростью клубочковой фильтрации ($R_s = -0,48$; $p<0,05$, Beta $-0,05$, $p=0,04$) и величины экскреции с мочой cGMP с сывороточным уровнем альбумина ($R=0,51$; $p<0,01$ и Beta $0,85$, $p=0,043$), что обосновывает использование этих биомаркеров в мониторинге активности/тяжести течения ХГН, особенно учитывая неинвазивность теста определения мочевой экскреции cGMP.
4. Исследование сывороточного уровня pro ANP и мочевой экскреции cGMP имеет значение в определении прогноза ХГН: уровень pro ANP в плазме крови выше 4,68 пмоль/л и величина экскреции с мочой cGMP ниже 43,56 пмоль/мл с чувствительностью соответственно 75% и 100% и специфичностью-93,33% и 66,67%, указывают на неблагоприятный прогноз течения ХГН с высоким риском присоединения/ухудшения почечной недостаточности или персистенции рефрактерного нефротического синдрома.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

У больных протеинурическими формами ХГН изучение плазменного уровня прогормона натрийуретического пептида (pro ANP) и экскреции с мочой циклического гуанозинмонофосфата (cGMP) иммуноферментным методом ELISA позволяет проводить стратификацию риска прогрессирующего течения ХГН: больные, имеющие плазменный уровень pro ANP - более 4,68 пмоль/л, и/или

экскрецию с мочой сGMP- ниже 43,56 пмоль/мл, представляют собой группу высокого риска неблагоприятного течения заболевания (прогрессирование почечной недостаточности и/или персистенция рефрактерного нефротического синдрома). Именно эта группа больных требует активного лечения с присоединением всего спектра средств подавления активности ХГН, в том числе, биоинженерных препаратов таргетного воздействия, на основе персонализированного подхода.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1.** Пулин А.А., Кустова Т.Ю., Фомин В.В., Мухин Н.А. Значение натрийуретических пептидов в оценке водно-солевого обмена при хронической болезни почек. // **Терапевтический архив. 2014. Т. 86. № 1. С. 95-102.**
- 2.** Пулин А.А., Кустова Т.Ю., Бровко М.Ю., Козловская Л.В., Фомин В.В. 1, Мухин Н.А. Клиническая оценка циркулирующего (pro-ANP) и локально-почечного (сGMP) натрийуретических пептидов при протеинурических формах хронических гломерулонефритов. // **Клиническая нефрология. 2014. №4. С. 21-25.**
- 3.** Пулин А.А., Бровко М.Ю., Кустова Т.Ю., Козловская Л.В., Фомин В.В., Мухин Н.А. Клиническое значение биомаркеров водно-натриевого обмена, выявляемых в сыворотке крови и моче у пациентов с протеинурическими формами хронического гломерулонефрита. // **Терапевтический архив. 2014. Т. 86. №6. С. 24-29.**
- 4.** Фомин В.В., Пулин А.А., Аксенова О.А., Кустова Т.Ю., Гирина С.С., Рощупкина С.В., Кудрявцев В.А., Варшавский В.А., Голицына Е.П., Дамулин И.В., Панасюк В.В., Мухин Н.А. Тяжелое поражение подоцитов, выявленное при электронной микроскопии почечного биоптата, у пациента с болезнью Фабри без выраженных изменений мочи и почечной недостаточности. // **Клиническая нефрология. 2012. №1. С. 55-58.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ - артериальная гипертония
АД - артериальное давление
ГКС - глюкокортикостероиды
ГУ - гематурия
ДАД - диастолическое артериальное давление
ИМТ - индекс массы тела
МС - мочевого синдром
НС - нефротический синдром
ПЗ - преднизолон
ПН - почечная недостаточность
ПУ - протеинурия
РААС - ренин-ангиотензин-альдостероновая система
САД - систолическое артериальное давление
СКФ - скорость клубочковой фильтрации
УЗИ - ультразвуковое исследование
ФСГС - фокально-сегментарный гломерулосклероз
ХБП - хроническая болезнь почек
ХГН - хронический гломерулонефрит
ХСН - хроническая сердечная недостаточность
ЦФА - циклофосфамид
ЭхоКГ - эхокардиография
ЭУ - эритроцитурия
ANP - предсердный натрийуретический пептид
сGMP - циклический гуанозинмонофосфат
NO - оксид азота
PAN - пурамицин-аминонуклеозид
Pro ANP - предшественник предсердного натрийуретического пептида