

На правах рукописи

Саганова Елена Сергеевна

**Клинико-морфологическая оценка значимости биомаркеров в диагностике
клубочковых и тубулоинтерстициальных повреждений у больных с
гломерулопатиями**

14.01.29 - Нефрология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Смирнов Алексей Владимирович – директор Научно-исследовательского института нефрологии, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Мазуренко Сергей Олегович – заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней медицинского факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования Санкт-Петербургского государственного университета, доктор медицинских наук, профессор.

Савенкова Надежда Дмитриевна - заведующая кафедрой факультетской педиатрии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.090.01 при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6-8, тел.: 8(812)338-71-04, e-mail.: usovet@spb-gmu.ru) в зале заседаний Ученого Совета.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.1spbgmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Марченко В.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время «золотым» стандартом диагностики в нефрологии является нефробиопсия, которая позволяет как установить патоморфологический диагноз, так и оценить характер и выраженность необратимых морфологических изменений, определяющих прогноз нефропатии, активность патологического процесса, а, следовательно, оказать безусловное влияние на выбор тактики ведения (Glassock R.J. et al., 2015). Однако нефробиопсия оценивает лишь небольшой объем почечной паренхимы, может не отражать наличие фокальных процессов и, являясь инвазивной процедурой, не позволяет осуществлять динамический контроль за прогрессией необратимых морфологических изменений (гломеруло-, тубулоинтерстициальный склероз), за редким исключением выполнения повторных нефробиопсий в клинике (Luciano R. L., Moeckel G.W., 2019).

Современный набор неинвазивных инструментов для оценки динамики патологического процесса в почках весьма ограничен и в практической работе, главным образом, базируется на мониторинге СКФ и протеинурии. Однако до настоящего времени остается нерешенным вопрос об оптимальном методе оценки СКФ с этой целью. Валидность практически всех, известных на сегодня, расчетных формул СКФ (по креатинину, цистатину С, их комбинации) доказывалась в проспективных исследованиях на основании корреляции со скоростью прогрессирования нефропатии (Inker L.A. et al., 2011; Inker L.A. et al., 2012; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012).

Однако ни в одном из этих исследований не анализировалась связь между динамикой СКФ и степенью выраженности необратимых морфологических изменений в почечной паренхиме. В связи с этим, до сих пор остается неясным, какая из формул определения СКФ способна лучше всего предсказывать характер морфологических изменений в почечной паренхиме и отражать их динамику в ходе течения болезни.

Примерно такая же ситуация сложилась в нефрологии и в отношении протеинурии, когда ее абсолютные значения или степень снижения в результате лечения пытаются коррелировать со скоростью прогрессирования гломерулопатии, оцениваемой по уровню той же расчетной СКФ, а не по морфологической картине.

В последнее время все больше внимания уделяется исследованиям, в которых изучается полный набор протеинов мочи (протеомика) при различных нефропатиях (Konvalinka A., et al., 2012; Mischak H., et al., 2015; Siwy J., et al., 2017). Первые результаты таких исследований свидетельствуют, что изменения в составе белкового профиля мочи коррелируют с отдельными морфологическими признаками нефропатий и могут отражать динамику патологического процесса, что послужило основанием для появления нового термина в нефрологии «жидкостная биопсия» (Mischak H., et al., 2015;

Argilés A., et al., 2013; Siwy J., et al., 2017) . Однако протеомные исследования сложны и дорогостоящи, требуют наличия специальной лабораторной и мультидисциплинарной команды квалифицированных специалистов. Поэтому наиболее рациональным представляется путь, когда по результатам протеомного анализа отбираются наиболее значимые в клинко-морфологическом отношении молекулы (биомаркеры) и далее разрабатываются более простые и доступные для практики иммунологические методы их определения в биологических средах (Good D., et al., 2010; Haubitz M., et al., 2009; Gold D., et al., 2010).

Естественно, что в последующем необходимы исследования для валидации биомаркеров в клинике. Большинство научных исследований, опубликованных на эту тему, рассматривает биомаркеры в качестве предикторов скорости прогрессирования ХБП, оцениваемой по расчетной СКФ, не принимая во внимание степень выраженности и динамику формирования необратимых морфологических изменений в почечной паренхиме, что объясняется невключением в дизайн исследование нефробиопсии (Gansevoort R. T., et al., 2011; Haynes R., et al., 2011; Fassett R. G., et al., 2011; Reichert L. J., et al., 1997; Bakoush O., et al., 2001; Remuzzi G., et al., 2004; Branten A. J. W., et al., 2005; Bolignano D., et al., 2008; Bolignano D., et al., 2009; Massy Z. A. and Druke T. B., 2012).

Таким образом, вопрос о предиктивной роли рутинных показателей (протеинурия, расчетная СКФ) и специфических биомаркеров в отношении детекции склеротических изменений в различных компартментах почечной паренхимы, являющихся морфологическим субстратом прогрессии гломерулопатий, остаётся до настоящего времени окончательно нерешенным и требует проведения дальнейших научных исследований в этом направлении.

Цель работы – дать клинко-морфологическую оценку диагностической значимости рутинных лабораторных и расчетных показателей, а также некоторых специфических биомаркеров в отношении степени выраженности необратимых склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме при первичных гломерулопатиях.

Задачи исследования:

1. При анализе нефробиоптатов провести полуколичественную оценку степени выраженности основных морфологических признаков (гломеруло-, тубулоинтерстициальный склероз, атрофия эпителия канальцев) с использованием общепринятой международной системы оценки степени выраженности повреждений в 25% и 50% у пациентов с первичными гломерулопатиями.
2. С помощью ROC-анализа дать оценку диагностической значимости рутинным показателям функционального состояния почек (креатининемии, протеинурии и СКФ,

оцененной по клиренсу креатинина и по расчетным формулам), в отношении предикции основных морфологических признаков различной степени выраженности, характеризующих формирование склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме.

3. С помощью ROC-анализа дать оценку диагностической значимости некоторым биомаркерам морфофункционального состояния почек (цистатин С и NGAL в сыворотке крови, мочевая экскреция трансферрина, IgG, NGAL, альфа1- и бета2-микроглобулина, цистатина С, экскретируемая фракция магния), в отношении предикции основных морфологических признаков различной степени выраженности, характеризующих формирование склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме.
4. На основе проведенного анализа из всего набора изученных традиционных показателей и специфических биомаркеров выбрать наиболее валидные в отношении предикции основных морфологических признаков, характеризующих формирование склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме различной степени выраженности.

Научная новизна

Впервые показано, что традиционные показатели, используемые в клинической практике (концентрация креатинина в сыворотке крови, протеинурия) не являются ранними маркерами гломеруло-, тубулоинтерстициального склероза, а также атрофии эпителия канальцев у пациентов с первичными гломерулопатиями.

Впервые установлен уровень креатинина сыворотки крови, свидетельствующий о наличии выраженных (50% и более) необратимых склеротических и атрофических изменений почечной паренхимы у пациентов с первичными гломерулопатиями.

Впервые приведены доказательства того, что у пациентов с первичными гломерулопатиями величина клиренса креатинина на $1,73\text{м}^2$ поверхности тела, по своей значимости в плане выявления тяжести фибротических и атрофических процессов в почечной паренхиме, превосходит результаты всех основных расчетных методик определения СКФ и позволяет диагностировать данные морфологические изменения уже на ранних стадиях ХБП (1-2 ст.).

Впервые показано, что концентрация NGAL, как в сыворотке крови, так и в моче является ранним диагностическим маркером начальных стадий гломерулосклероза.

Впервые установлено, что мочевая экскреция трансферрина, IgG, альфа1- и бета2-микроглобулина, а также величина экскретируемой фракции магния с мочой, обладают умеренным предиктивным значением в отношении тубулоинтерстициального склероза и атрофии канальцевого эпителия.

Теоретическая и практическая значимость настоящего исследования заключается в выборе оптимальных значений как рутинных (креатинин, СКФ, суточная протеинурия), так и некоторых специфических биомаркеров (цистатин С, NGAL, альфа1-микроглобулин, бета2-микроглобулин, трансферрин, IgG, NGAL, экскретируемая фракция магния) сыворотки крови и мочи, позволяющих использовать их не только в качестве важного дополнительного теста для интегральной персонализированной оценки различной степени выраженности фибротических и атрофических изменений в почечной паренхиме у пациентов с первичной гломерулярной патологией, но и проводить динамическую оценку гломеруло-, тубулоинтерстициального склероза, атрофии канальцевого эпителия, в том числе на фоне проводимой терапии. Особое значение биомаркеры приобретают в тех клинических ситуациях, когда выполнение нефробиопсии невозможно.

Методология и методы исследования. Научная методология диссертационного исследования основывается на системном подходе к изучаемой проблеме, последовательном применении методов научного познания (наблюдение, измерение, анализ, построение гипотез). В работе использованы клинические, общенаучные и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Предикторная способность рутинных показателей (креатинин сыворотки крови, суточная протеинурия, экскретируемая фракция магния с мочой), а также биомаркера цистатина С (сыворотки крови и мочи) в характеристике склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме при первичных гломерулопатиях ограничена и диагностически значима лишь в отношении выраженных степеней морфологических изменений (50% и более)
2. Все варианты расчетных формул СКФ, рекомендованных для использования в клинической практике, обладают предикторной способностью в отношении склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме различной степени выраженности. Однако только СКФ, рассчитанная по клиренсу креатинина, обладает подобной предикторной способностью при самых высоких пороговых значениях СКФ, что позволяет диагностировать морфологические изменения на более ранних этапах течения гломерулопатии уже с ХБП 1-2 ст.
3. В качестве предиктора ранних стадий гломерулосклероза при всех вариантах первичных гломерулопатий наибольшее диагностическое значение принадлежит оценке NGAL сыворотки крови и мочи (пороговые уровень 100,26 нг/л и 1445,4 нг/сут, соответственно)

4. Различная степень выраженности тубулоинтерстициального склероза и атрофии эпителия канальцев у всех пациентов с первичными гломерулопатиями может быть предсказана с помощью оценки уровней мочевого экскреции альфа1- и бета2-микроглобулинов (пороговые уровни 10,94 мг/сут и 0,224 мкг/сут, соответственно)
5. У пациентов с установленным иммуноморфологическим диагнозом IgA-нефропатии и уровнем суточной протеинурии, не превышающим 1,25 г/сут, в качестве дополнительных предикторов формирования тубулоинтерстициального склероза и атрофии эпителия канальцев ранних степеней выраженности выступают уровни мочевого экскреции трансферрина и IgG (пороговые уровни 31,92 мг/сут и 22,59 мг/сут, а также 5,10 мг/сут и 10,67 мг/сут, соответственно).

Личный вклад автора в проведенное исследование. Автором лично обследовано 100 пациентов с первичной гломерулярной патологией и создана электронная база данных, включающая результаты клинических и научно-клинических исследований. Диссертантом был проведён отбор пациентов для включения в исследование, также осуществлялся процесс сбора проб биологического материала для измерения концентраций цистатина С, NGAL, трансферрина, IgG, альфа1-микроглобулина, бета2-микроглобулина, магния и выполнялась преаналитическая подготовка образцов для иммуноферментного и иммунотурбидиметрического анализов. Автором была составлена электронная база данных и проведена статистическая обработка, анализ и оформление результатов исследования.

Внедрение результатов исследования. Основные результаты исследования внедрены в клиническую, научную, практическую деятельность Научно-исследовательского института нефрологии Научно-клинического исследовательского центра ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты исследования и основные положения данной работы были представлены на заседаниях нефрологической секции Санкт-Петербургского общества терапевтов имени С.П.Боткина (Санкт-Петербург, 2013, 2017 и 2020 гг.), на Объединенном съезде научного общества нефрологов России (IX съезд НОНР) и ассоциации нефрологов (31 октября - 1 ноября 2019 г, Москва), на 50-м, 51-м, 54-м, 55-м и 56-м Конгрессах Европейской Почечной Ассоциации – Европейской Ассоциации Диализа и Трансплантации (ERA-EDTA 50th Congress, Стамбул, Турция, 18-21 мая 2013 г., ERA-EDTA 51th Congress, Амстердам, Нидерланды, 31 мая – 6 июня 2014 г., ERA-EDTA 54th Congress, Мадрид, Испания, 3 – 6

июня 2017 г., ERA-EDTA 55th Congress, Копенгаген, Дания, 24 – 27 мая 2018 г., ERA-EDTA 56th Congress, Будапешт, Венгрия, 13 – 16 июня 2019 г) и на Конгрессах Американского Общества Нефрологов (Kidney Week 2018, Сан Диего, Калифорния, 23-28 октября 2018 г, Kidney Week 2019, Вашингтон, 5-10 ноября 2019 г).

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них четыре статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Работа включает введение, главу обзор литературы, одну главу по описанию пациентов и методов исследования, две главы, посвященные результатам собственного исследования, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации и список литературы. Диссертация изложена на 221 странице машинописного текста, иллюстрирована 80 таблицами, 32 рисунками и 1 схемой. Библиографический список содержит 240 источника, 12 отечественной и 228 зарубежной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Поперечное обсервационное исследование было выполнено на базе НИИ Нефрологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова Минздрава России. Исследуемая группа больных составила 100 человек, из них 48 женщин и 52 мужчины, 34% - пациенты молодого возраста от 20 до 30 лет (медиана – 39 лет интерквартильный размах – 27 – 54 года). Основными критериями включения, помимо нозологической формы (первичная гломерулярная патология, подтвержденная в период госпитализации по данным нефробиопсии), были: наличие по крайней мере 10 клубочков, пригодных для анализа в биоптате, отсутствие клинико-лабораторных и морфологических проявлений ОПП в соответствии с критериями KDIGO 2012. Критериями невключения были: наличие онкологических заболеваний, тяжелой сердечной (III-IV стадии по NYHA), дыхательной недостаточности (более II ст.), текущих инфекционных заболеваний, клинических проявлений ИБС (стенокардия напряжения III-IV ф.к., острый инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия), гемодинамически значимых нарушений сердечного ритма, проведение заместительной почечной терапии как в анамнезе, так и на момент включения в исследование, злоупотребление алкоголем, выполнение рентгенконтрастных процедур в течение 1 года до момента обследования, прием высоких доз ГКС (по преднизолону более 10 мг/сут), рН мочи <6,0. Распределение больных по морфологической форме было следующим: болезнь минимальных изменений 9%, фокально-сегментарный гломерулосклероз 28%, мембранозная нефропатия 26%, IgA – нефропатия 37%. В

исследуемой группе преобладали пациенты с ранними стадиями ХБП (ХБП С1-2) – 65 человек, поздние стадии ХБП (С4-5) были диагностированы только в 13 случаях.

Все пациенты прошли комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, соответствующее принятым стандартам в нефрологии. Всем обследованным была выполнена диагностическая нефробиопсия с последующим светооптическим, иммунофлуоресцентным и ультраструктурным исследованием. Для оценки уровня креатинина в крови/моче применялся энзиматический метод, реактивы фирмы «Beckman Coulter» (США) на анализаторе Uni Cel DxС 800 PRO «Beckman Coulter» (США). Исследование суточной протеинурии (г/сут) проводилось методом с пирогаллоловым красным (реактивы «Вектор Бест», Россия), на анализаторе «Белур» (Россия). Определение СКФ (мл/мин/1,73м²) проводилось по нескольким методикам: как с использованием креатинина сыворотки крови (клиренс креатинина, формула MDRD, СКD-EPICr 2009) цистатина С сыворотки крови (формула Hoek, СКD-EPICysC 2012), так и их комбинации (СКD-EPICr-CysC 2012)

Уровень цистатина С сыворотки определялся методом иммунотурбидиметрии (наборы фирмы Alfresa Pharma Corporation, Japan) на приборе Furuno CA-90 (Furuno Electric Co., Ltd., Japan). На автоматическом биохимическом анализаторе Furuno CA-90 (Furuno Electric Co., Ltd., Japan) проводилось исследование экскреции с мочой трансферрина, иммуноглобулина G, цистатина С, альфа1-микроглобулина, бета2-микроглобулина методом иммунотурбидиметрии наборами фирмы «Артес» (Бельгия). Уровень NGAL сыворотки крови и его мочевого экскреция определялись методом иммуноферментного анализа (наборы фирмы BioVendor, Czech Republic). Концентрация магния определялась в сыворотке крови и моче количественным колориметрическим методом без депротенизации, наборами фирмы «Витал Девелопмент Корпорейшен» (Россия) на полуавтоматическом биохимическом анализаторе «Виталон» Rayto Life and Analytical Scences Co., Ltd (Шензен, Китай).

При патоморфологическом исследовании оценивалось общее число клубочков, доля клубочков с фокальным, тотальным склерозом (количественно), степень фиброза тубулоинтерстиция, клеточной инфильтрации тубулоинтерстиция, атрофии эпителия канальцев, зернистой, гиалиново-капельной и вакуольной дистрофии эпителия канальцев (полуколичественно). Для комплексной оценки гломерулосклероза использовался показатель общего гломерулосклероза, рассчитанный как сумма доли клубочков с фокальным и тотальным склерозом от общего числа клубочков в исследуемом нефробиоптате. Исследование проводилось в два этапа с последовательным разделением пациентов на группы в зависимости от выраженности склеротических и атрофических изменений почечной паренхимы.

Полный статистический анализ был проведен с использованием статистических программ Statistica v.12 (Statsoft Inc., USA) и MedCalc Statistical Software v.15.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Все полученные данные заметно отличались от нормального распределения, в связи с чем количественные значения были представлены в виде медианы с минимальным и максимальным значениями или 25-75% межквартильным размахом (IQR), а категориальные данные – в виде значений и процентов. Для оценки различий между двумя независимыми группами использовался U критерий Манна-Уитни. Для оценки корреляций между количественными переменными вычислялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для качественной оценки значимости биомаркеров в диагностике морфологических изменений проводился ROC-анализ. Оценка площадей под ROC-кривыми и их сравнение проводилось при помощи оценки стандартной ошибки, рассчитанной по методике Хэнли и Макнил и точного 95% доверительного интервала (ДИ) на основе биномиального распределения. Сопоставление ROC-кривых для исследуемых диагностических критериев проводилось на основании оценки разницы их площадей с учетом стандартной ошибки по методике ДеЛонг и уровня статистической значимости. На основании полученных результатов, с учетом исследовательского характера данной работы, значения $p < 0,05$ принимались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам линейного корреляционного анализа, а также попарном сравнении групп было установлено, что и креатинин, и цистатин С сыворотки крови были ассоциированы с выраженностью морфологических изменений почечной паренхимы, таких как гломерулосклероз, тубулоинтерстициальный склероз, атрофия канальцевого эпителия у пациентов с первичной гломерулярной патологией ($p < 0,001$). Для определения диагностической значимости данных биомаркеров был проведен ROC-анализ с последующим попарным сравнением площадей под ROC-кривыми. Согласно полученным результатам, креатинин и цистатин С сыворотки крови в равной степени обладали высокой диагностической значимостью в отношении продвинутых стадий гломеруло-, тубулоинтерстициального склероза и атрофии эпителия канальцев при пороговых значениях, не превышающих, 0,115 ммоль/л и 1,82 мг/л, соответственно.

В свою очередь, величина СКФ, вне зависимости от методики ее расчета, являлась не только интегральным показателем, отражающим функциональное состояние почек, но и, согласно представленным в нашей работе данным, с высокой диагностической значимостью отражала наличие и ранних (25% выраженности), и продвинутых (50% выраженности) морфологических изменений, таких как гломеруло-, тубулоинтерстициальный склероз, атрофия канальцевого эпителия.

В то же время, детальный анализ пороговых значений СКФ, полученных при помощи ROC-анализа, позволил установить, что лишь величина СКФ по клиренсу креатинина, отражала начальные проявления (не более 25% выраженности) гломеруло-, тубулоинтерстициального склероза и атрофии канальцевого эпителия при более высоких значениях СКФ, в сравнении с другими методиками расчета СКФ, а соответственно, уже на ранних стадиях ХБП (1-2 ст.) позволяет судить о наличии данных изменений в почечной паренхиме.

Таблица 1. Пороговые значения СКФ в мл/мин, рассчитанной по различным методикам, в диагностике склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме 25% выраженности

Формула расчета СКФ	ГСК	ТИС	Атрофия эпителия канальцев
	25%	25%	25%
Ccr	65	79	94
MDRD	51	65	65
СКД-EPICr	53	68	83
HoekCysC	38	60	42
СКД-EPICys	32	60	44
СКД-EPICrCys	49	62	64

Примечания: ГСК – гломерулосклероз; ТИС – тубулоинтерстициальный склероз.

Представленные выше данные свидетельствуют также и о том, что, несмотря на высокую диагностическую значимость СКФ (вне зависимости от методики ее расчета), зачастую необратимые морфологические изменения почечной паренхимы присутствуют уже на начальных стадиях ХБП, что позволяет предполагать наличие гиперфльтрации в каждом отдельно взятом нефроне, как причины «запаздывания» снижения СКФ по отношению к имеющимся морфологическим изменениям. Данное обстоятельство позволяет говорить о некоторых ограничениях использования величины СКФ в роли маркера ранних признаков склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме и требует более комплексной оценки с применением других биомаркеров.

В качестве альтернативного биомаркера нами был исследован NGAL сыворотки крови, в роли предиктора необратимых морфологических изменений. По результатам ROC-анализа было установлено, что NGAL сыворотки крови является высокочувствительным маркером ранних признаков гломерулосклероза, при пороговом уровне 100,26 нг/мл, соответствующим величине СКФ 97 мл/мин по клиренсу креатинина (ХБП С1) (Рисунок 1). Таким образом, уже на первой стадии ХБП, определение

концентрации данного низкомолекулярного пептида в сыворотке крови позволяет судить о наличии начальных фибропластических процессов в гломерулярном отделе нефрона.

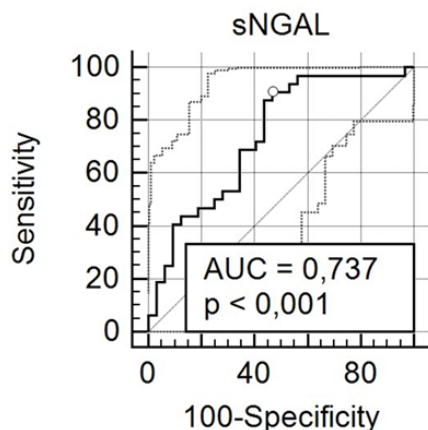


Рисунок 1. Характеристическая ROC-кривая с 95% доверительным интервалом в общей группе для NGAL сыворотки крови относительно гломерулосклероза, выраженностью 25%.

Согласно данным линейного корреляционного анализа уровень суточной протеинурии был ассоциирован с выраженностью гломеруло- ($p < 0,001$), тубулоинтерстициального склероза ($p < 0,001$) и атрофии канальцевого эпителия ($p < 0,001$). Однако при проведении ROC-анализа было установлено, что суточная экскреция белка с мочой не отражает выраженность гломерулосклероза, а может свидетельствовать с весьма умеренной диагностической точностью о начальных проявлениях тубулоинтерстициального склероза выраженностью до 25%, а также продвинутых стадий атрофии канальцевого эпителия, при пороговых значениях 1,82 г/сут и 6,10 г/сут, соответственно (Рисунок 2).

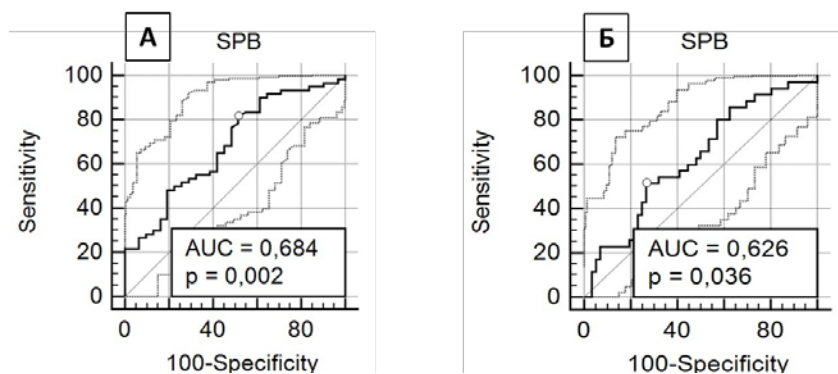


Рисунок 2. Характеристические ROC-кривые в общей группе для суточной протеинурии относительно: А – тубулоинтерстициального склероза, выраженностью 25%; Б – атрофии эпителия канальцев, выраженностью 50%.

Учитывая данные результаты, нами была проведена оценка валидности экскреции некоторых специфических протеинов различной молекулярной массы в отношении предикции морфологических изменений. Так, суточная экскреция трансферрина и IgG с мочой коррелировали с выраженностью склероза тубулоинтерстиция и атрофией канальцевого эпителия ($p=0,043$ $r=0,38$; $p=0,039$ $r=0,38$ и $p=0,021$ $r=0,43$; $p=0,016$ $r=0,45$, соответственно) только при IgA-нефропатии, в связи с чем, оценка их диагностической значимости в дальнейшем была проведена в данной группе пациентов.

По данным ROC-анализа было установлено, что в группе пациентов с IgA-нефропатией суточные экскреции трансферрина и IgG являются значимыми предикторами тубулоинтерстициального склероза и атрофии канальцевого эпителия, выраженностью 25%, при пороговых значениях 31,92 мг/сут и 5,10 мг/сут для трансферрина и 22,59 мг/сут и 10,67 мг/сут для IgG, соответственно (Рисунок 3).

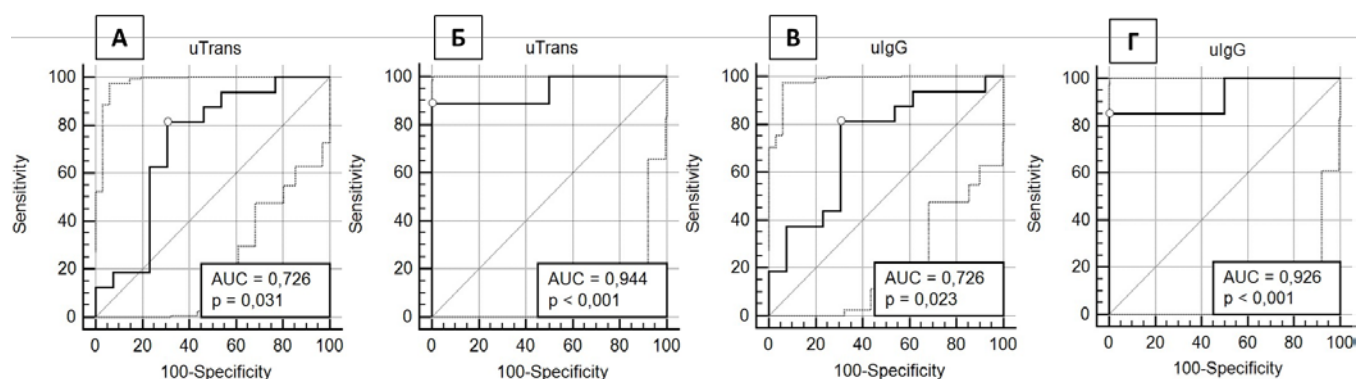


Рисунок 3. Характеристические ROC-кривые в группе с IgA-нефропатией для суточной экскреции трансферрина с мочой (относительно тубулоинтерстициального склероза, выраженностью 25% (А), атрофии эпителия канальцев, выраженностью 25% (Б) и IgG (относительно тубулоинтерстициального склероза, выраженностью 25% (В) и атрофии эпителия канальцев, выраженностью 25% (Г)).

Также было установлено, что данные пороговые уровни экскреции трансферрина соответствуют величине протеинурии равной 1,07 г/сут и 1,25 г/сут, а для IgG – 1,25 г/сут. Таким образом, можно заключить, что при IgA-нефропатии экскреции трансферрина и IgG с мочой являются важным диагностическим маркером начального склероза тубулоинтерстиция и атрофии канальцевого эпителия, на ранних стадиях развития патологического процесса, при величине протеинурии, не превышающей 1,25 г/сут.

Величина экскреции бета2-микроглобулина с мочой прямо и значимо коррелировала с выраженностью гломеруло- ($p=0,001$ $r=0,34$), тубулоинтерстициального ($p=0,001$ $r=0,33$) склероза и атрофии канальцев ($p=0,002$ $r=0,32$), тогда как для альфа1-микроглобулина - только со склерозом тубулоинтерстиция ($p < 0,001$ $r=0,37$). Согласно следующему этапу

анализа было установлено, что величина экскреции бета2-микроглобулина с мочой 0,224 мкг/сут позволяет говорить о наличии в биоптате гломерулосклероза, выраженностью 50%, а также склероза тубулоинтерстиция и атрофии канальцевого эпителия, равных 25%. Нарастание порогового уровня до 0,240 мкг/сут, ассоциировалось с продвинутыми стадиям склероза тубулоинтерстиция (50% и более). Кроме того, было показано, что данные пороговые уровни экскреции бета2-микроглобулина соответствовали суточной протеинурии равной 5,998 г/сут, которая в свою очередь оказалась менее чувствительным маркером тубулоинтерстициального склероза при сравнении с экскрецией бета2-микроглобулина, а в отношении гломерулосклероза (в целом) и атрофии канальцевого эпителия 25% выраженности в принципе не обладала предикторной способностью (Рисунок 4).

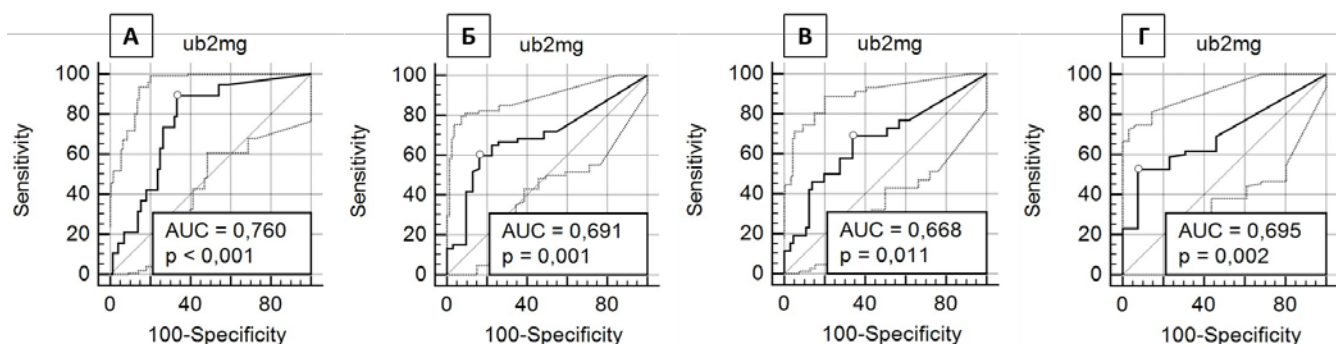


Рисунок 4. Характеристические ROC-кривые в общей группе для суточной экскреции бета2-микроглобулина с мочой относительно: гломерулосклероза, выраженностью 50% (А), тубулоинтерстициального склероза, выраженностью 25% (Б) и выраженностью 50% (В) и атрофии эпителия канальцев, выраженностью 25% (Г).

В качестве дополнительного маркера, характеризующего наличие в почечной паренхиме ранних признаков тубулоинтерстициального склероза (не более 25%), может быть использована оценка суточной экскреции альфа1-микроглобулина, не превышающая 10,94 мкг/сут. Кроме того, данный биомаркер оказался более специфичным в отношении оценки тубулоинтерстициального склероза, выраженностью до 25%, чем соответствующий ему уровень суточной протеинурии (1,82 г/сут).

Несмотря на наличие тесной корреляции между величиной экскреции цистатина С с мочой и других низкомолекулярных пептидов (прежде всего альфа1- и бета2-микроглобулинами) согласно некоторым исследованиям, в нашей работе выявлено мало взаимосвязей между выраженностью необратимых морфологических изменений и суточной экскрецией цистатина С с мочой. Так, концентрация цистатина С в суточной моче не превышающая 319,9 мкг/сут, с весьма умеренной диагностической значимостью

позволяет утверждать о наличии в нефробиоптате тубулоинтерстициального склероза 25%. Однако валидность данного низкомолекулярного пептида в отношении ранних признаков склероза тубулоинтерстициального компартмента, согласно полученным результатам, оказалась сопоставима с использованием суточной протеинурии в этих же целях.

Единственным низкомолекулярным пептидом, уровень мочевого экскреции которого статистически достоверно отражал выраженность гломерулосклероза, был NGAL. Суточная экскреция NGAL с мочой прямо и с высокой статистической достоверностью ($p < 0,001$, $r=0,48$) коррелировала с выраженностью гломерулосклероза. По данным ROC-анализа было установлено, что величина экскреции NGAL с мочой не превышающая 1445,4 нг/сут, с достаточно высокой достоверностью указывает на наличие гломерулосклероза, выраженностью не более 25%. Стоит отметить, что данный пороговый уровень NGAL мочи, соответствовал величине суточной протеинурии равной 3,8 г/сут, который, в свою очередь, не обладал статистической значимостью в отношении гломерулосклероза (Рисунок 5).

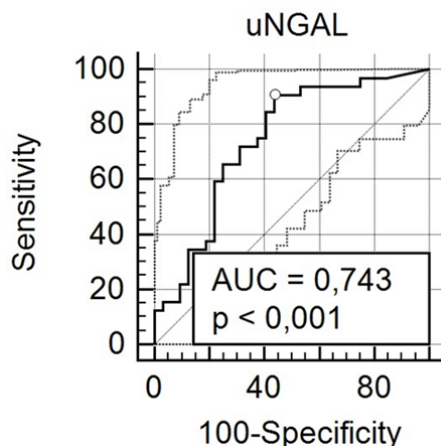


Рисунок 5. Характеристическая ROC-кривая в общей группе для суточной экскреции NGAL с мочой относительно гломерулосклероза, выраженностью 25%.

При прогрессировании склеротических и атрофических изменений почечной паренхимы у пациентов с первичной гломерулярной патологией достоверным маркером, позволяющим судить в продвинутых стадиях данных морфологических изменений в почечной паренхиме (50% и более выраженности), оказалась оценка экскретируемой фракции магний. По данным анализа было установлено, что уровень экскретируемой фракции магния с мочой прямо коррелировал с гломеруло-, тубулоинтерстициальным склерозом и атрофией эпителия канальцев ($p=0,021$ $r=0,24$; $p=0,040$ $r=0,25$; $p=0,006$ $r=0,29$, соответственно). Кроме того, согласно результатам ROC-анализа, экскретируемая фракция магния с мочой являлась высокоспецифичным показателем, отражающим

поздние стадии фибропластических и атрофических изменений почечной паренхимы при первичной гломерулярной патологии, при пороговом уровне 5,33% (Рисунок 6).

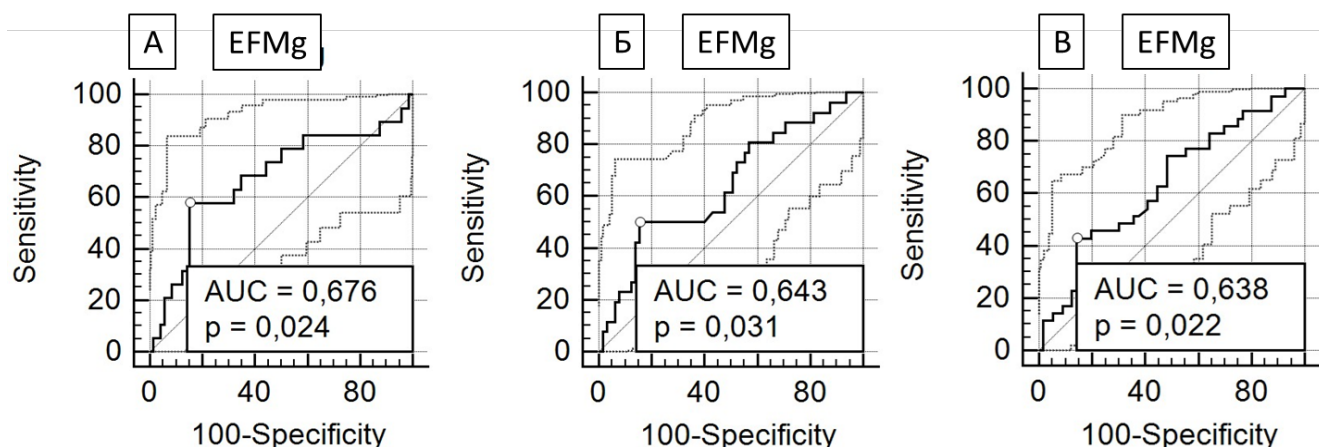


Рисунок 6. Характеристические ROC-кривые в общей группе для экскретируемой фракции магния с мочой относительно: А – гломерулосклероза, выраженностью 50%; Б – тубулоинтерстициального склероза, выраженностью 50%; В – атрофии эпителия канальцев, выраженностью 50%;

Одним из неоспоримых преимуществ экскретируемой фракции магния является отсутствие взаимосвязи с уровнем протеинурии, что подтверждается не только результатами настоящего исследования ($p > 0,05$), но и данными литературы.

ВЫВОДЫ

1. Креатинин крови не может быть отнесен к группе маркеров ранних стадий формирования склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме при первичных гломерулопатиях. Уровень креатинина крови, равный 0,115 ммоль/л, является пороговым для вынесения суждения о 50% степени выраженности гломерулосклероза, тубулоинтерстициального склероза и атрофии эпителия канальцев.
2. Величина суточной потери белка с мочой не отражает степень выраженности гломерулосклероза в почечной паренхиме, но может свидетельствовать о формировании начальной стадии тубулоинтерстициального склероза 25% выраженности при пороговом значении 1,82 г/сут. Нефротический уровень протеинурии, равный 6,10 г/сут, ассоциируется с выраженной (50%) атрофией эпителия канальцев.
3. По сравнению с различными расчетными формулами СКФ, рекомендованными к использованию в клинической практике, только СКФ, определенная на основе

клиренса креатинина с пересчетом на 1,73 м² стандартную поверхность тела, позволяет судить о различной степени выраженности морфологических изменений в почечной паренхиме при более высоких пороговых значениях показателя, соответствующего более ранним стадиям ХБП, для гломерулосклероза (65 мл/мин), склероза тубулоинтерстиция (79 мл/мин) и атрофии канальцевого эпителия (94 мл/мин), выраженностью 25%.

4. Оценка уровней NGAL в сыворотки крови (пороговый уровень 100,26 нг/л) и его мочевой экскреции (пороговый уровень 1445,4 нг/сут) позволяют диагностировать раннюю стадию формирования гломерулосклероза (25% выраженности). Нарастание концентрации NGAL в сыворотки крови до 107,73 нг/л и более, ассоциируется с атрофией эпителия канальцев 50% степени выраженности. Экскреция NGAL с мочой достоверно не отражает динамики формирования тубулоинтерстициального склероза и атрофии эпителия канальцев в почечной паренхиме.
5. Оценка уровня цистатина С в сыворотки крови или моче, по сравнению с креатининемией или протеинурией (соответственно), не имеет каких-либо существенных преимуществ в установлении степени выраженности склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме при первичных гломерулопатиях.
6. У пациентов с IgA-нефропатией и умеренной протеинурией (не выше 1,25 г/сут) уровни мочевой экскреции трансферрина и IgG могут быть использованы в качестве биомаркеров 25% степени выраженности тубулоинтерстициального склероза (пороговые уровни 31,92 и 22, 59 мг/сут, соответственно), а также атрофии эпителия канальцев 25% степени выраженности (пороговые уровни 5,10 и 10,67 мг/сут, соответственно).
7. Уровень мочевой экскреции бета2-микроглобулина равный 0,224 мкг/сут обладает предиктивной способностью в отношении гломерулосклероза, выраженностью 50% и тубулоинтерстициального склероза 25% выраженности. Уровень мочевой экскреции бета2-микроглобулина, равный 0,240 мкг/сут, ассоциируется с тубулоинтерстициальным склерозом, выраженностью 50%.
8. Уровень мочевой экскреции альфа1-микроглобулина, равный 10,94 мг/сут, ассоциирован с наличием в почечной паренхиме тубулоинтерстициального склероза, выраженностью 25%.
9. Оценка экскретируемой фракции магния, равная 5,33%, отражает продвинутые стадии (50% и более) склеротических и атрофических процессов в почечной паренхиме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании проведена детальная оценка диагностической значимости, как традиционных, так и некоторых специфических биомаркеров в отношении предикции характера и степени выраженности склеротических и атрофических процессов почечной паренхимы, лежащих в основе прогрессирования ХБП, у пациентов в первичной гломерулярной патологией. Впервые показано, что оценка традиционных показателей, таких как креатинин сыворотки крови, а также суточная протеинурия, преимущественно отражает продвинутые степени фибропластических и атрофических процессов в почечной паренхиме. Также проведен детальный анализ различных методик расчёта СКФ в качестве маркеров необратимых морфологических изменений, согласно которому все исследуемые нами формулы в равной степени характеризуют характер и степень выраженности фибропластических и атрофических процессов почечной паренхимы, однако лишь величина СКФ по клиренсу креатинина позволяет диагностировать начальные признаки данных изменения уже на ранних стадиях ХБП. Продемонстрирована эффективность применения NGAL (при пороговом уровне в сыворотки крови 100,26 нг/л, в моче - 1445,4 нг/сут) в качестве единственного маркера, отражающего ранние стадии гломерулосклероза, а также практическая значимость использования экскреции протеинов различной молекулярной массы (трансферрина, иммуноглобулина G, альфа1-микроглобулина, бета2-микроглобулина) в качестве предикторов состояния тубулоинтерстициального компартмента.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки выраженности необратимых изменений различных отделов нефрона, у пациентов с первичной гломерулярной патологией, определение СКФ должно проводиться с использованием клиренса креатинина.
2. Для оценки ранних признаков гломерулосклероза, у пациентов с первичной гломерулярной патологией, при значениях клиренса креатинина, превышающих 90 мл/мин (ХБП С1), необходимо определение уровня NGAL в сыворотке крови (пороговый уровень - 100,26 нг/л) и в моче (пороговый уровень - 1445,4 нг/сут).
3. Для оценки тубулоинтерстициального склероза, выраженностью 25%, необходимо использовать комплексное определение альфа1-микроглобулина (пороговый уровень - 10,94 мг/сут), цистатина С мочи (пороговый уровень - 319,9 мг/сут), а также бета2-микроглобулина (пороговый уровень - 0,224 мкг/сут).
4. У пациентов с IgA-нефропатией и протеинурией не более 1,25 г/сут, на ранних стадиях ХБП, с целью диагностики начальных стадий формирования тубулоинтерстициального склероза и атрофии эпителия канальцев, следует применять

исследование мочевой экскреции трансферрина и IgG мочи (пороговые уровни 31,92 и 22, 59 мг/сут, а также 5,10 и 10,67 мг/сут, соответственно).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Галкина О.В., Зубина И.М., Богданова Е.О., Сиповский В.Г., Смирнов А.В. Роль некоторых биомаркеров в оценке характера хронического повреждения почек у пациентов с первичными гломерулопатиями // Нефрология. - 2013. - Т. 17, № 1. - С. – 60 - 69.
2. Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Галкина О.В., Зубина И.М., Богданова Е.О., Сиповский В.Г., Смирнов А.В. Диагностическая значимость цистатина С и нейтрофильного липокалина, ассоциированного с желатиназой, при первичных гломерулопатиях // Терапевтический архив. - 2013. - Т. 85, № 6. - С. 10-16.
3. Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Смирнов А.В. Биомаркеры в диагностике острого повреждения почек. Сообщение I // Нефрология. - 2014. - Т.18, № 4. - С. 25-35.
4. Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Смирнов А.В., Зверьков Р.В. Биомаркеры в диагностике острого повреждения почек. Сообщение II // Нефрология. - 2014. - Т. 18, № 6. С. - 51-58.
5. Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Галкина О.В. Значение биомаркеров в предиктивной диагностике острого повреждения почек. // глава в кн.: Острое повреждение почек / А.В. Смиронов, В.А. Добронравов, А.Ш. Румянцев, И.Г. Каюков. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2015. - С. 87-106
6. Саганова Е.С., Галкина О.В., Левыкина Е.Н. Экскретируемая фракция магния в диагностике гломерулосклероза // Ремедиум Приволжье. – 2017. – Т.8, №158. - С. 24
7. Proletov Ia., Saganova E., Galkina O., Bogdanova E., Zubina I., Sipovskii V., Smirnov A. The role of NGAL and cystatin-C estimation in patients with primary glomerulopathies. // Nephrology dialysis transplantation. – 2013. – Vol. 28, Suppl.1. – P. 403.
8. Saganova E., Proletov Ia., Galkina O., Bogdanova E., Zubina I., Sipovskii V., Smirnov A. Diagnostic value of some urinary biomarkers in estimation of tubulointerstitial injury in patients with primary glomerulopathies. // Nephrology dialysis transplantation. – 2014. – Vol. 29, Suppl.3. – P. 195.
9. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. Diagnostic value of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of tubulointerstitial damage in

- patients with primary glomerulonephritis. // Nephrology Dialysis Transplantation. - 2017. – Vol. 32, Suppl.3. – P. 143.
10. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. Comparative assessment of diagnostic value of various glomerular filtration rate estimating equations as predictors of tubulointerstitial damage in patients with primary glomerulonephritis. // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2017. – Vol. 32, Suppl.3. – P. 146
 11. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. The role of fractional excretion of magnesium as a predictor of various morphological features in primary glomerulonephritis. // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2017. – Vol. 32, Suppl. 3. – P. 497.
 12. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. Multi-marker approach for prediction of morphological lesions in patients with glomerulonephritis. // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2018. – Vol. 33, Suppl.1. – P. 22-23.
 13. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. Serum cystatin C level indicates early glomerular and tubular interstitial lesions in patients with primary glomerulonephritis. // Nephrology Dialysis Transplantation. - 2018. – Vol. 3, Suppl.1. – P. 22-23.
 14. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. Serum Cystatin C Is a Significant Marker of Early Glomerular and Tubular Interstitial Lesions in Patients with Primary Glomerulonephritis: Results from Single Center Cross-Sectional Single-Blind Study. // J Am Soc Nephrol. - 2018. – Vol. 29, Suppl. – P. 835.
 15. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. First-in-Man Cross-Sectional Single Center Study of Multimarker Panel Validation for Early Prediction of Morphological Lesions in Patients with Primary Glomerulonephritis. // J Am Soc Nephrol. - 2018. – Vol. 29, Suppl. – P. 835.
 16. Saganova E., Galkina O., Sipovskii V., Smirnov A. Developing the model of decision tree algorithm using biomarkers panel for the differential diagnosis of primary glomerulonephritis. // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2019. – Vol. 34, Suppl.1. – P.
 17. Bogdanova E., Galkina O., Saganova E., Zubina I., Sipovskii V., Smirnov A. Beta-2 microglobulin is a potential early biomarker of glomerular and tubulointerstitial lesions in patients with glomerulopathy. // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2019. – Vol. 34, Suppl.1. – P.
 18. Саганова Е.С., Галкина О.В., Сиповский В.Г., Смирнов А.В. Диагностическое значение экскреции липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов, в качестве раннего предиктора морфологических изменений у пациентов с первичными гломерулопатиями. // Нефрология. - 2019. - Т. 23, Приложение 1. - С. 66.

19. Богданова Е.О., Галкина О.В., Саганова Е.С., Зубина И.М., Левыкина Е.Н., Сиповский В.Г., Смирнов А.В. Бета-2 микроглобулин ранний биомаркер гломерулярного и тубулярного повреждения у пациентов с гломерулопатиями. // Нефрология. - 2019. - Т. 23, Приложение 1. - С. 59.

Список сокращений и условных обозначений

IgA-нефропатия – иммуноглобулин А нефропатия

IgG – иммуноглобулин G

NGAL – нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)

ГКС – глюкокортикостероиды

ROC – характеристическая кривая (receiver operating characteristic)

ГСК – гломерулосклероз

СКФ – Скорость клубочковой фильтрации

ТИС – тубулоинтерстициальный склероз

ХБП – хроническая болезнь почек

EFMg – экскретируемая фракция магния с мочой, %

CCr – клиренс креатинина