

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК: 616.611–002–053.2–07–037

САВОШ
Виктория Викторовна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ
ЗНАЧЕНИЕ ТУБУЛОИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ
ИЗМЕНЕНИЙ В РАЗВИТИИ ПЕРВИЧНЫХ
ГЛОМЕРУЛОПАТИЙ У ДЕТЕЙ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальностям 14.00.15 – патологическая анатомия
14.00.48 – нефрология

Минск 2010

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Научные руководители: **Черствый Евгений Давыдович**,
доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки Республики
Беларусь, заведующий кафедрой патологи-
ческой анатомии УО «Белорусский государ-
ственный медицинский университет»

Сукало Александр Васильевич,
доктор медицинских наук, профессор, член-
корреспондент НАН Беларуси, заслуженный
деятель науки Республики Беларусь, заве-
дующий 1-й кафедрой детских болезней
УО «Белорусский государственный меди-
цинский университет»

Официальные оппоненты: **Швед Иван Адамович**,
доктор медицинских наук, профессор, глав-
ный научный сотрудник Центральной
научно-исследовательской лаборатории ГУО
«Белорусская медицинская академия после-
дипломного образования»

Вильчук Константин Устинович,
кандидат медицинских наук, доцент дирек-
тор ГУ РНПЦ «Мать и дитя»

Оппонирующая организация: УО «Гродненский государственный
медицинский университет»

Защита состоится 7 мая 2010 г. в 14⁰⁰ часов на заседании совета по
защите диссертаций Д 03.18.02 при УО «Белорусский государственный
медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинско-
го, 83. Телефон ученого секретаря: 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский
государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «___» апреля 2010 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
кандидат медицинских наук, доцент



А. И. Герасимович

ВВЕДЕНИЕ

Прогрессирование хронических заболеваний почек с нарастанием хронической почечной недостаточности (ХПН), требующей заместительной почечной терапии, является одной из основных проблем в теоретической и практической нефрологии. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике различных нозологических форм гломерулопатий, многие патогенетические аспекты прогрессирования хронических заболеваний почек остаются неясными.

В настоящее время многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали особое значение изменений тубулоинтерстициального компонента (ТИК) в формировании хронической почечной недостаточности [D. Goumenos и соавт., 1996; A.A. Eddy и соавт., 2001]. Установлено, что из всего спектра клинических проявлений заболеваний почек можно выделить только два независимых фактора, играющих роль в прогрессировании ХПН: протеинурию и уровень артериального давления [Н.В. Мосина и соавт., 2004; J.C. Peterson и соавт., 1995]. Несмотря на то, что получено достаточное количество экспериментальных и клинических данных, подтверждающих существование связи между протеинурией, интерстициальным фиброзом и развитием хронической почечной недостаточности, тем не менее, не выделен комплекс информативных и доступных клиничко-морфологических прогностических критериев различных вариантов течения гломерулопатий, которые позволили бы определить тактику ведения этих больных и уточнить критерии выбора нефропротекторной и патогенетической терапии.

В связи с этим, изучение патогенетических механизмов формирования тубулоинтерстициальных изменений является важным для понимания фундаментальных основ прогрессирования хронических заболеваний почек и прогноза течения первичных гломерулопатий. Все это определяет актуальность изучения проблемы и новизну подобных исследований.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами

Работа выполнена в рамках темы НИР по Государственной комплексной программе научных исследований «Современные технологии в медицине» «Изучение молекулярных маркеров прогрессирования гломерулопатий, факторов риска, особенностей диагностики и коррекции диабетических остеопатий для оптимизации их диагностики и лечения», договор № 41-3/08 от 12.03.2008 г., темы НИР Белорусского республикан-

ского фонда фундаментальных исследований «Исследование роли трансформирующего фактора роста- β в морфогенезе интерстициального фиброза при хронических гломерулонефритах», договор № Б08-222 от 01.04.2008 г.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: установить роль тубулоинтерстициальных изменений в прогрессировании хронических заболеваний почек у детей на основании оценки состояния экстрацеллюлярного матрикса и канальцев при различных нозологических формах первичных гломерулопатий.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать выраженность и распространенность фиброзных и воспалительных изменений интерстициальной ткани при различных морфологических формах гломерулопатий у детей в материале нефробиопсий, а также в зависимости от клинических проявлений заболевания.

2. Определить характер и распространенность экспрессии маркера миофибробластической дифференцировки клеток (гладкомышечного актина- α) в ткани почек при различных морфологических вариантах гломерулопатий и его роль в развитии фиброзных изменений стромы.

3. Оценить с применением морфометрических методов характер и распространенность экспрессии трансформирующего фактора роста- β и компонентов экстрацеллюлярного матрикса (коллагена IV типа, фибронектина) в зависимости от морфологии изменений клубочков и интерстиция у детей.

4. Установить характер взаимосвязей между морфологическими и иммуногистохимическими изменениями интерстициального компонента и клиническими проявлениями различных нозологических форм гломерулопатий.

5. Выявить морфологические, в том числе иммуногистохимические, факторы, определяющие прогноз течения заболевания и развития хронической почечной недостаточности у детей с первичными гломерулопатиями.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования был материал пункционных нефробиопсий.

Предмет исследования – тубулоинтерстициальные изменения при различных морфологических вариантах гломерулопатий.

Положения, выносимые на защиту

1. Первичные гломерулярные заболевания почек у детей сопровождаются различными по характеру и степени выраженности изменениями интерстиция и канальцев. Выраженные интерстициальные изменения (фиброз и воспалительная инфильтрация) выступают в качестве морфоло-

2. Ремоделирование интерстициального матрикса при первичных гломерулопатиях характеризуется увеличением количества клеток с миофибробластической дифференцировкой (в результате эпителиально-мезенхи-мальной трансформации канальцевых эпителиоцитов) и накоплением

в экстрацеллюлярном матриксе коллагена IV типа и фибронектина. Степень интерстициального фиброза нарастает в динамике развития почечного заболевания преимущественно за счет увеличения количества фибронектина, усиление экспрессии которого в сочетании с увеличением показателя экспрессии гладкомышечного актина- α выступают в качестве морфологических предикторов быстрого прогрессирования заболевания

3. Протеинурия является неблагоприятным фактором в развитии тубулоинтерстициальных изменений, поскольку сопровождается нарастанием степени интерстициального фиброза в результате увеличения числа миофибробластов и повышения экспрессии трансформирующего фактора роста- β .

Личный вклад соискателя

Постановка проблемы, формулировка целей и задач исследования, положений, выносимых на защиту проведены совместно с научными руководителями. Автором лично выполнены анализ научной литературы и медицинской документации, иммуногистохимическое исследование с предварительной отработкой методики окрашивания (подбор оптимального режима демаскировки антигена и разведения первичных антител) и последующей методологической разработкой оценки полученных данных. Проведена статистическая обработка результатов, их изложение и внедрение в практику. Пересмотр архивных гистологических препаратов осуществлялся совместно с доцентом кафедры патологической анатомии, канд. мед. наук Т.А. Летковской.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертации доложены на XXII Европейском конгрессе патологов (Италия, Флоренция, 2009), 42-й ежегодной конференции Европейской ассоциации детских нефрологов (Франция, Лион, 2008), Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы морфологической диагностики заболеваний» (Витебск, 2008), Международном семинаре «Вопросы детской нефрологии на современном этапе» (Минск, 2009), заседании Минского городского общества патологоанатомов (Минск, 2009), научной сессии БГМУ (Минск, 2008 и 2009).

Опубликованность результатов

По тематике исследования опубликовано 14 печатных работ. Из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, в которых изложены главные результаты диссертации, 5 – в сборниках научных трудов, 3 – тезисы докладов, 1 – рационализаторское предложение. Общий объем публикаций составил 2,0 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, основной части, состоящей из 4 глав, включающих обзор литературы, материал и методы исследований, результаты собственных исследований и обсуждения полученных результатов, заключения, списка использованных источников и списка публикаций соискателя, приложений. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста с таблицами и иллюстрациями, содержит 16 таблиц и 79 рисунков. Список литературы включает 10 русскоязычных и 169 иностранных источников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на архивном и текущем материале нефробиопсий, выполненных в нефрологическом отделении 2-й детской клинической больницы г. Минска за период с января 2000 по декабрь 2008 гг. включительно. Из исследования исключались все варианты вторичных гломерулопатий (диабетическая нефропатия, волчаночный нефрит, поражения почек при других заболеваниях соединительной ткани и васкулитах), а также первичные тубулоинтерстициальные поражения и нефробиопсии, выполненные у больных с интермиттирующей и терминальной стадиями хронической почечной недостаточности. Также в исследование не включались случаи с недостаточным количеством в биоптате почечной паренхимы для последующего морфометрического анализа.

В результате для дальнейшего исследования было отобрано 132 нефробиопсии. Из них у 100 пациентов нефробиопсии выполнялись однократно для верификации диагноза, а у 16 детей через различные временные промежутки (от 6 месяцев до 5 лет) были выполнены повторные биопсии для контроля динамики процесса или уточнения морфологического варианта гломерулопатии.

Клинические данные о пациентах были получены из сопроводительной документации (карт направления на патогистологическое исследование), историй болезни и включали возраст пациента и длительность заболевания на момент выполнения биопсии, наличие и характер мочевого

синдрома (уровни протеинурии, эритроцитурии, наличие кристаллов солей) и экстраренальных проявлений (отеки, артериальная гипертензия и т. д.), а также показатели общего и биохимического анализов крови (мочевина, креатинин, скорость клубочковой фильтрации (СКФ), рассчитанная по формуле Шварца).

Для оценки морфологических изменений в ткани почек из архивных парафиновых блоков, полученных при проведении пункционных нефробиопсий делались срезы толщиной 3–4 мкм, которые депарафинировались в ксилоле возрастающей концентрации, обезвоживались в спиртах и окрашивались гематоксилином и эозином, по Массону, Марциус алым голубым (Martius Scarlet Blue; MSB), реактивом Шиффа (ШИК-реакция), выполнялось серебрение по Джонсу, а также во всех случаях проводилось иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием поликлональных антител (Ат) к иммуноглобулинам класса А (IgA). При анализе данных весь исследуемый материал был разбит на группы в соответствии с гистологическими критериями различных вариантов гломерулопатий согласно комплексной классификации Всемирной организации здравоохранения (1995 г.) (таблица 1).

Таблица 1. Распределение случаев в зависимости от морфологического варианта поражений клубочков

Морфологический вариант гломерулопатии	Число наблюдений
Минимальные изменения клубочков (МИ)	31
Мезангиопролиферативный гломерулонефрит (МзПГН)	29
Болезнь Берже (ББ)	29
Мезангиокапиллярный гломерулонефрит (МзКГН)	14
Фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС)	29

Оценка морфологических параметров проводилась с использованием светового оптического микроскопа «Leica» при увеличении 100, 200, 400 и 1000. При исследовании срезов, окрашенных по Массону и MSB, полуколичественно в баллах оценивалась степень выраженности интерстициального фиброза (межканальцевой, перигломерулярной и периваскулярной стромы): 0 – отсутствие изменений в почечном интерстиции, 1 балл – незначительное диффузное или очаговое умеренное расширение межканальцевой стромы, 2 балла – умеренное диффузное или очаговое выраженное расширение межканальцевой стромы, 3 балла – наличие диффузного выраженного интерстициального фиброза. Оценка степени выраженности воспалительной инфильтрации стромы проводилась полуколичественно в баллах на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином: 0 – отсутствие изменений в почечном интерстиции; 1 балл – наличие

отдельных очагов незначительной инфильтрации стромы; 2 балла – выявление слабовыраженной распространенной или очаговой умеренно-выраженной инфильтрации интерстициальной ткани; 3 балла – наличие диффузной умеренно-выраженной с очаговым усилением до выраженной интерстициальной воспалительной инфильтрации.

С целью определения изучаемых молекул миофибробластической дифференцировки, факторов роста и компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) в материале нефробиопсий, выполнено ИГХ окрашивание с моноклональными Ат к гладкомышечному актину-альфа (α -SMA) (DAKO, 1:400), трансформирующему фактору роста- β (ТФР- β) (MILLIPORE S.A.S., 1:2000), коллагену IV типа (DAKO, 1:25) и поликлональными Ат к фибронектину (DAKO, 1:1000). Система визуализации – EnVision (DAKO). Перед проведением ИГХ исследования отработана методика окрашивания с подбором оптимального режима демаскировки антигена и разведения первичных Ат. Во всех случаях использован положительный и отрицательный контроль ИГХ реакции. Окраска расценивалась как положительная только при отсутствии окрашивания в отрицательном контрольном препарате.

При проведении ИГХ исследования во всех случаях обнаруживалась экспрессия ТФР- β различной интенсивности в клубочках и интерстициальной ткани почки в виде цитоплазматического окрашивания миофибробластов, эндотелиальных клеток, мезангиоцитов и клеток канальцевого эпителия. Экспрессия α -SMA отмечалась в виде четкого цитоплазматического окрашивания интерстициальных миофибробластов, гладкомышечных клеток почечных сосудов и отдельных клеток канальцевого эпителия. Экспрессия коллагена IV типа выявлялась во всех нефробиоптатах в виде четкого окрашивания базальных мембран канальцев и капилляров клубочков, а также капсулы Шумлянско-Боуэна. Кроме того, экспрессия коллагена отмечалась при расширении межканальцевой стромы и в участках с наличием воспалительной инфильтрации. Фибронектин обнаруживался в клубочках почки, преимущественно в участках расширенного мезангиального матрикса и гломерулосклероза, а также в интерстициальной ткани почек.

Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 5–6 полях зрения (объектив 40), а также 10 полях зрения (объектив 100) с разрешением 1798 на 1438 пикселей при помощи микроскопа Leica с цифровой камерой Leica. Площадь исследуемых полей зрения составила $298,47 \times 238,71 = 71247,77 \text{ } \mu\text{m}^2$ (увеличение $\times 40$) и $113,53 \times 98,29 = 11158,86 \text{ } \mu\text{m}^2$ (увеличение $\times 100$) соответственно. Оценка ИГХ реакции всех вышеперечисленных маркеров проводилась с использованием про-

граммного обеспечения для морфометрии Aperio Image Scope, автоматически измеряющего распространенность и интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции диаминобензидин-хромогена). В дальнейшем рассчитывался показатель экспрессии (ПЭ), равный отношению числа позитивных пикселей к их общему числу.

Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., 2001 г.). Полученные результаты обработаны статистически с вычислением медианы, 25-го и 75-го перцентилей, средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m). Для оценки характера распределения полученных данных использовались критерий Колмогорова–Смирнова, а также показатели эксцесса и асимметрии. Взаимосвязь между показателями определялась при помощи непараметрического двустороннего коэффициента корреляции Спирмена (r_s) и рангового коэффициента корреляции Кендалла (Kendall Tau). Для сравнительной характеристики признаков использованы следующие непараметрические методы: сравнение двух независимых выборок – U-критерий Манна–Уитни, сравнение трех и более независимых выборок – H-критерий Крускала–Уоллиса, сравнение двух зависимых выборок – Z-критерий Уилкоксона. Оценка сроков развития почечной недостаточности включала расчеты по моментному методу Каплана–Мейера. Сравнение данных в различных группах осуществлялось с использованием теста log-rank. За уровень статистической значимости принимался $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тубулоинтерстициальных изменений при первичных гломерулопатиях

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии изменений при всех изученных вариантах поражений клубочков. Изменения ТИК наблюдались в 79 случаях ($59,85 \pm 4,3\%$) и были представлены интерстициальными инфильтрацией и фиброзом, а также дистрофией и атрофией канальцев, выраженность и распространенность которых варьировала в значительной степени. Канальцевые изменения были представлены гиалиново-капельной дистрофией эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев, а также очаговой атрофией канальцевого эпителия (преимущественно в участках выраженного стромального фиброза).

Интерстициальная инфильтрация отмечалась в 41 случае (31,06±4,0%). Клеточный состав инфильтратов характеризовался различным сочетанием клеток лимфоцитарного и гистиоцитарного рядов с примесью небольшого количества нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов, преимущественно в очагах выраженной инфильтрации. Степень выраженности воспалительной инфильтрации варьировала. В большинстве случаев (21 наблюдение, 51,2%) она была представлена немногочисленными очагами слабой или умеренной степени, в остальных случаях имел место очагово-диффузный характер инфильтрации умеренной (13 случаев, 31,7%) и/или выраженной (7 случаев, 17,1%) степени. Интерстициальный фиброз различной степени выраженности отмечался в большинстве случаев (79 наблюдений или 59,8%). В 73,4% исследованных биоптатов (58 случаев) определялись очаги слабовыраженного или умеренно-выраженного склероза стромы, располагавшегося преимущественно перигломерулярно и/или периваскулярно, а также очаговое расширение межканальцевой стромы слабой степени. В остальных наблюдениях (26,6% случаев) можно было видеть более значительные интерстициальные изменения: диффузное расширение межканальцевой, перигломерулярной и периваскулярной стромы умеренной степени с очаговым усилением до выраженного фиброза.

Максимальная выраженность интерстициальных изменений (как склеротических, так и воспалительных) отмечалась в группах МзКГН и ФСГС (критерий Крускала–Уоллиса $H=23,7$ и $37,9$ соответственно при $p<0,01$). В обеих группах интерстициальный фиброз и воспалительная инфильтрация наблюдались в большинстве случаев (64,3% и 82,8% соответственно). Они носили преимущественно очагово-диффузный характер, имели слабую или умеренную степени выраженности. Однако в части наблюдений имели место распространенные (до 50–60% площади биоптата) участки диффузного умеренного с очаговым усилением до выраженного межканальцевого фиброза и выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация. При минимальных изменениях клубочков соответствующими были и интерстициальные изменения – сочетание скудной очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрации с минимальным расширением межканальцевой, периваскулярной либо перигломерулярной стромы.

Как стало известно в последние годы, морфологический тип гломерулярных поражений не в полной мере определяет течение и прогноз почечного заболевания. Хотя в результате многолетних наблюдений и были выделены варианты гломерулопатий, чаще всего сопровождающиеся быстрым развитием ХПН (такие как ФСГС, МзКГН, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, волчаночный нефрит IV и V класса). В то же

время многочисленными исследованиями показано, что преимущественно интерстициальные изменения определяют прогноз заболевания и скорость развития почечной недостаточности при гломерулярных заболеваниях почек [R.A. Risdon и соавт., 1968; L.I. Schainuck и соавт., 1970; A. Bohle и соавт., 1977]. Таким образом, полученные нами результаты позволяют объяснить быстрое прогрессирование и плохой прогноз этих так называемых «неблагоприятных» форм гломерулопатий с точки зрения современных представлений о патогенезе развития хронической почечной недостаточности.

В результате проведенного исследования было установлено, что ПЭ a-SMA в почечном интерстиции значительно варьирует в зависимости от характера изменений клубочков и выраженности интерстициального фиброза. Наиболее выраженная его экспрессия была выявлена у больных с неблагоприятными морфологическими вариантами гломерулопатий (ФСГС и МзКГН) (критерий Крускала–Уоллиса $H=24,3$ при $p<0,01$), а также в участках склеротических изменений стромы (критерий Крускала–Уоллиса $H=29,3$ при $p<0,01$). Также была установлена прямая достоверная корреляционная взаимосвязь средней силы между уровнем экспрессии a-SMA и выраженностью как интерстициального фиброза ($r=0,43$, $p=0,0001$), так и воспалительной инфильтрации стромы ($r=0,46$, $p=0,0000$). Фиброзные изменения интерстиция на фоне увеличения числа миофибробластов обусловлены их синтетической активностью – в условиях фиброгенеза эти клетки продуцируют большое количество матричных белков, что подтверждает наличие прямой корреляционной зависимости между экспрессией a-SMA и количеством в почечном интерстиции молекул экстрацеллюлярного матрикса (фибронектин и коллаген IV типа) ($r_s=0,54$, $p=0,021$ и $r_s=0,36$, $p=0,045$ соответственно).

Помимо интерстициальной экспрессии a-SMA в отдельных случаях также отмечалось слабое и/или умеренное окрашивание эпителия почечных канальцев, что указывает на возможность происхождения интерстициальных миофибробластов в результате процесса эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) канальцевых клеток. Значение ЭМТ в развитии фиброзных изменений почечного интерстиция достаточно широко освещены в имеющейся литературе, однако, большинство исследований проведены на экспериментальных моделях нефритов, либо отдельных нозологических формах гломерулопатий у взрослых [Y. Liu и соавт., 2004; G. D'Amico и соавт., 1992].

В ходе проведенного исследования было установлено, что формирование интерстициального фиброза характеризуется появлением и накоплением в строме почки вне базальной мембраны коллагена IV типа. Также

отмечалось более выраженная экспрессия фибронектина в зонах интерстициального фиброза и воспалительной инфильтрации стромы ($r_s=0,31$, $p=0,0004$ и $r_s=0,27$, $p=0,0017$ соответственно). Данная закономерность была также подтверждена в результате сравнения групп с различной степенью интерстициального фиброза с использованием непараметрического критерия Крускала–Уоллиса (таблица 2). Было обнаружено достоверное увеличение выраженности экспрессии коллагена IV типа и фибронектина при нарастании степени как фиброзных, так и воспалительных изменений в строме почки при различных морфологических вариантах гломерулопатий.

Таблица 2. Результаты статистического анализа (Крускала–Уоллиса) выраженности экспрессии молекул ЭЦМ в зависимости от степени интерстициальной инфильтрации и фиброза

	Зависимость от степени интерстициального фиброза		Зависимость от степени воспалительной инфильтрации	
	Н	р	Н	р
Коллаген IV типа	37,1	0,017	34,2	0,027
Фибронектин	19,5	0,002	23,1	0,008

Полученные данные подтверждают важную роль фибронектина в формировании интерстициальных изменений. Этот адгезивный гликопротеин формирует основу для накопления других белков, а также, выступая в роли хемоаттрактанта для фибробластов, способствует привлечению в очаг формирующегося фиброза еще большего количества профиброгенных клеток [M. Zeisberg и соавт., 2001]. Кроме того, фибронектин является лигандом для адгезивных молекул – интегринов, принимающих участие в процессах миграции клеток моноцитарного ряда, их локального взаимодействия друг с другом и окружающим матриксом, тем самым способствует формированию и поддержанию интерстициального воспалительного инфильтрата [F.P. Schena и соавт., 1988]. Косвенным подтверждением его хемотаксического действия является выявленная прямая корреляционная связь между воспалительной инфильтрацией и количеством фибронектина в почечной интерстиции ($r_s=0,27$, $p=0,0017$).

В нашем исследовании анализ взаимосвязи экспрессии α -SMA, ТФР- β , фибронектина и клинических данных выявил статистически достоверную корреляционную взаимосвязь между уровнем суточной протеинурии и позитивностью экспрессии вышеуказанных молекул. При сравнении выраженности экспрессии α -SMA и ТФР- β с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни были выявлены более высокие значе-

ния ПЭ этих маркеров у больных с нефротическим уровнем суточной протеинурии (>40 мг/кг/сут) вне зависимости от морфологии гломерулярных изменений. Также была выявлена зависимость выраженности интерстициального фиброза и воспалительной инфильтрацией стромы от уровня суточной протеинурии ($r_s=0,27$, $p=0,0043$ и $r_s=0,28$, $p=0,0036$ соответственно). Использование непараметрического теста Манна–Уитни позволило выявить достоверное увеличение степени и распространенности склеротических и воспалительных изменений стромы в группе пациентов с уровнем суточной протеинурии >40 мг/кг ($U=234,1$, $p=0,019$ и $U=137,2$, $p=0,036$ соответственно). Подобные изменения могут быть следствием сочетанного действия двух факторов – увеличением числа миофибробластов, усилением их синтетической активности под влиянием выраженной экспрессии ТФР- β при нарастании уровня суточной протеинурии (установлено пороговое значение неблагоприятного уровня суточной экскреции белка равное 40 мг/кг/сут). Результирующим эффектом влияния обоих показателей является накопление большого количества белков ЭЦМ и нарастание степени интерстициального фиброза, что позволяет рассматривать протеинурию в качестве неблагоприятного прогностического фактора в прогрессировании хронических болезней почек

Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тубулоинтерстициальных изменений при первичных гломерулопатиях в материале повторных пункционных нефробиопсий

Повторная нефробиопсия была выполнена у 14 пациентов для коррекции лечения или уточнения морфологического диагноза. Спектр морфологических вариантов гломерулопатий в этой группе представлен в таблице 3. Между группами с различными вариантами гломерулопатий не было достоверных различий по возрасту.

Таблица 3. Спектр морфологических вариантов гломерулопатий, возрастной и половой состав в группе повторных нефробиопсий

Морфологический диагноз	Число случаев			Средний возраст, лет
	мальчики	девочки	все	
МзПГН	–	3	3	10,7±3,77
Б. Берже	2	2	4	
МзКГН	-	3	3	
ФСГС	3	1	4	

Длительность заболевания на момент выполнения первой биопсии составила $22,4 \pm 3,8$ мес. Интервал между первой и повторной биопсиями колебался от 8 до 55 месяцев, в среднем составил $25,4 \pm 9,1$ мес. Группы с различными морфологическими вариантами гломерулопатий не отлича-

лись между собой как по длительности заболевания на момент выполнения первой биопсии, так и по промежутку времени до повторной биопсии.

В динамике в 7 случаях (с морфологическими вариантами ФСГС и ББ) отмечалось усиление выраженности интерстициальных изменений, как фиброза стромы, так и ее инфильтрации воспалительными клетками. Увеличение выраженности интерстициального фиброза носило статистически достоверный характер (критерий Уилкоксона $Z=2,9$, $p=0,023$). В изменении степени инфильтрации стромы не было выявлено статистически значимых закономерностей ($Z=0,36$, $p=0,67$). Отмечалась прямая корреляционная связь между выраженностью воспалительной инфильтрации в первой биопсии и степенью интерстициального фиброза во второй биопсии ($r_s=0,42$, $p=0,035$). В четырех наблюдениях в первой биопсии отмечалась незначительная или умеренная инфильтрация стромы и в трех из них в динамике отмечалось нарастание степени интерстициального фиброза (в одном случае – с умеренного до выраженного, в двух остальных – от слабовыраженного до умеренного).

Данные, полученные в процессе анализа материала первичных и повторных нефробиопсий, о том, что степень выраженности стромального фиброза увеличивается в динамике развития заболевания, также подтверждают большое значение интерстициальных изменений в прогрессировании гломерулярных заболеваний. Наряду с этим, отсутствие подобных закономерностей для воспалительной инфильтрации стромы в сочетании с выявленной достоверной корреляцией между ее выраженностью в первой биопсии и степенью интерстициального фиброза во второй биопсии свидетельствуют о преимущественной роли клеток инфильтрата в качестве триггерного фактора на начальных этапах фиброгенеза.

Проведенный статистический анализ выраженности экспрессии маркеров миофибробластической дифференцировки, молекул ЭЦМ (фибронектин, коллаген IV типа) и ТФР- β с использованием попарного сравнения с помощью критерия Уилкоксона позволил выявить следующие закономерности. Отмечается достоверное увеличение в материале повторной нефробиопсии ПЭ ТФР- β и фибронектина ($Z=2,13$, $p=0,032$ и $Z=2,43$, $p=0,015$ соответственно). Полученные данные носят оригинальный характер и свидетельствуют о важной роли фибронектина в процессе формирования и прогрессирования интерстициальных изменений.

Прогностическое значение тубулоинтерстициальных изменений и иммуногистохимических маркеров в развитии нарушений функции почек при первичных гломерулопатиях у детей

У 65 пациентов имелись данные об изменении клинико-биохимических показателей в течение от 10 до 85 месяцев с момента выполнения нефробиопсии. В 9 случаях в течение этого срока развилась хроническая почечная недостаточность 1–2 степени, в одном случае у ребенка с ФСГС – терминальная стадия ХПН. Кроме того, еще у 9 пациентов отмечались парциальные нарушения канальцевых функций.

Оценка влияния морфологических и иммуногистохимических изменений ТИК на развитие нарушений почечных функции у пациентов с различными морфологическими вариантами гломерулопатий была проведена с помощью непараметрического теста Каплан–Майера, где в качестве конечной точки использовалось развитие хронической почечной недостаточности как минимум 1-й степени. Выраженные склеротические и воспалительные изменения интерстициальной ткани в дебюте заболевания и/или на момент проведения нефробиопсии имели статистически значимый неблагоприятный эффект для развития ХПН у больных с различными морфологическими формами гломерулопатий (рисунок 1).

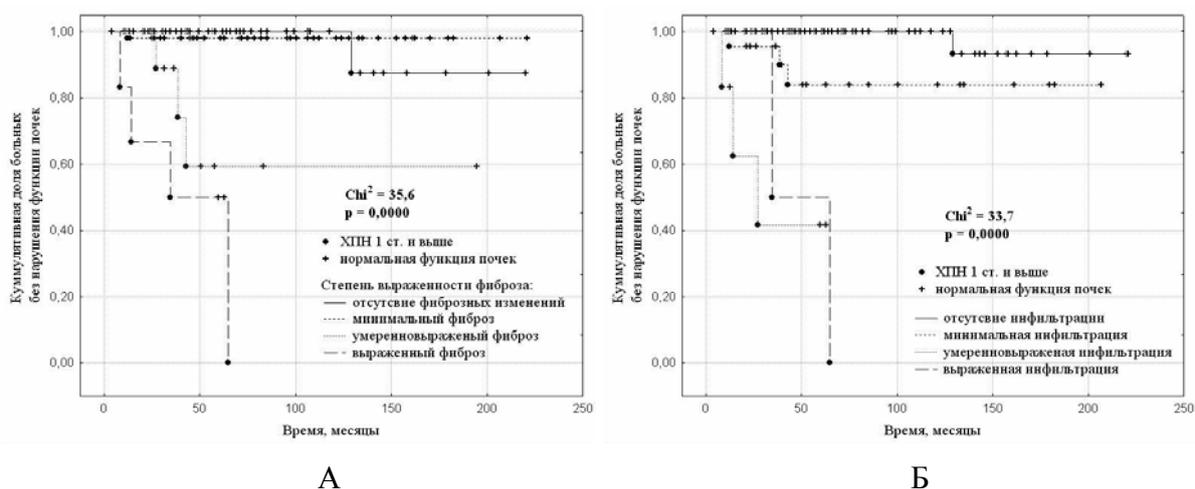


Рисунок 1 – Развитие ХПН у больных с первичными гломерулопатиями в зависимости от степени интерстициального фиброза (А) и инфильтрации (Б)

Для оценки влияния на скорость развития ХПН выраженности экспрессии изученных иммуногистохимических маркеров (α-SMA, ТФР-β, коллаген IV типа, фибронектин) все случаи были разделены на три группы по 33-му и 66-му перцентильям ПЭ. Так проведенный анализ продемонстрировал существенное неблагоприятное влияние на развитие нарушения функции почек увеличения выраженности экспрессии фибронектина и α-SMA (рисунок 2), тогда как количество коллагена IV типа и ТФР-β

в почечном интерстиции не имели отрицательного значения для прогноза в развитии ХПН ($p=0,27$ и $p=0,56$ соответственно).

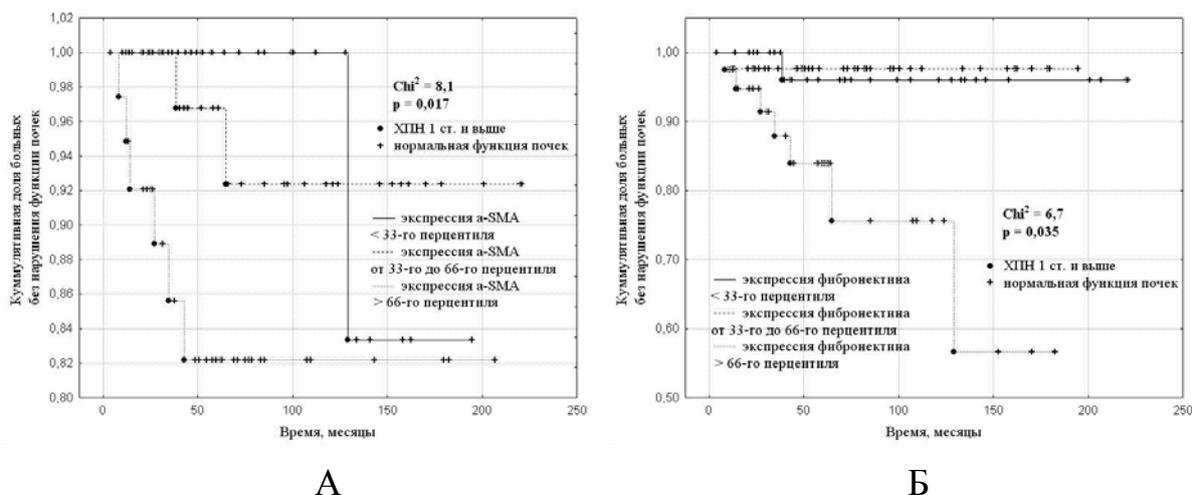


Рисунок 2 – Развитие ХПН у больных с первичными гломерулопатиями в зависимости от значения ПЭ α -SMA (А) и фибронектина (Б)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Наиболее выраженные тубулоинтерстициальные изменения отмечаются у больных с фокально-сегментарным гломерулосклерозом и мезангиокапиллярным гломерулонефритом ($N=24,35$, $p=0,0001$), тогда как остальные рассмотренные морфологические варианты поражений клубочков сопровождаются незначительными изменениями стромы. Это позволяет объяснить быстрое прогрессирование и плохой прогноз этих «неблагоприятных» форм гломерулопатий с точки зрения современных представлений о патогенезе развития хронической почечной недостаточности [2–4].

2. Увеличение степени фиброза стромы, прослеженное в динамике на материале повторных нефробиопсий свидетельствует о важной роли тубулоинтерстициальных изменений в прогрессировании гломерулярных заболеваний ($Z=2,9$, $p=0,023$). Отсутствие подобных закономерностей для воспалительной инфильтрации в сочетании с выявленной прямой корреляционной связью между ее выраженностью в первой биопсии и степенью интерстициального фиброза во второй биопсии ($r_s=0,42$, $p=0,035$) свидетельствуют о преимущественном значении клеток инфильтрата на начальных этапах фиброгенеза [4].

3. Степень экспрессии гладкомышечного актина- α в интерстициальной ткани почек значительно варьирует в зависимости от характера изменений клубочков и степени интерстициального фиброза. Наиболее выраженная его экспрессия отмечается у больных с неблагоприятными морфологическими вариантами гломерулопатий (фокально-сегментарный гломерулосклероз и мезангиокапиллярный гломерулонефрит) (показатели экспрессии равны 0,095 и 0,116 соответственно, $p=0,0001$), а также в случаях с выраженными склеротическими стромальными изменениями ($N=29,3$; $p=0,0000$). Фиброзные изменения интерстиция на фоне увеличения числа миофибробластов обусловлены их синтетической активностью – в условиях фиброгенеза эти клетки продуцируют большое количество матриксных белков, на что указывает корреляционная связь между экспрессией гладкомышечного актина- α и количеством коллагена IV типа и фибронектина в почечном интерстиции ($r_s=0,54$, $p=0,021$ и $r_s=0,36$, $p=0,045$ соответственно). Выявленная экспрессия гладкомышечного актина- α в эпителиоцитах почечных канальцев указывает на возможность происхождения интерстициальных миофибробластов в результате процесса эпителиально-мезенхимальной трансформации канальцевых клеток [2, 4, 6, 7, 9–11].

4. Развитие интерстициального фиброза характеризуется появлением в строме почки вне базальной мембраны коллагена IV типа и увеличением его количества по мере нарастания степени фиброзных изменений ($N=12,3$, $p=0,0054$). Также выявлено достоверное увеличение выраженности экспрессии фибронектина по мере нарастания степени стромального фиброза ($N=11,6$, $p=0,0087$). Обнаруженная прямая корреляционная связь между воспалительной инфильтрацией и количеством фибронектина в почечном интерстиции ($r_s=0,27$, $p=0,0017$), а также статистически значимое увеличение его экспрессии у пациентов с выраженным стромальным воспалением ($N=17,6$, $p=0,0005$) являются косвенным подтверждением его хемотаксического действия. Статистически значимое увеличение количества фибронектина в материале повторных нефробиопсий отмечается одновременно с увеличением степени фиброзных изменений соединительной ткани почек ($Z=2,43$, $p=0,015$) и свидетельствует о важной роли этого маркера в процессе развития тубулоинтерстициальных изменений [2, 4, 9, 10].

5. Продемонстрировано влияние уровня суточной протеинурии на выраженность интерстициальных изменений при первичных гломерулопатиях в виде значительного увеличения усиления экспрессии гладкомышечного актина- α и трансформирующего фактора роста- β в почечном интерстиции у пациентов с нефротическим уровнем протеинурии (более

40 мг/кг/сут) ($U=125,0$, $p=0,0011$ и $U=636,0$, $p=0,046$ соответственно) [2, 4, 8, 9–12].

6. Выраженные интерстициальный фиброз и инфильтрация стромы являются прогностически неблагоприятными факторами в развитии хронической почечной недостаточности у пациентов с первичными гломерулярными заболеваниями ($\chi^2=35,6$ и $\chi^2=33,7$ при $p<0,0001$). Неблагоприятными факторами прогноза течения заболевания являются также увеличение показателя экспрессии гладкомышечного актина- α и фибронектина в почечном интерстиции ($\chi^2=8,1$; $p=0,017$ и $\chi^2=6,7$; $p=0,035$ соответственно) [3, 4].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Использование предложенной методики оценки степени интерстициального фиброза и воспалительной инфильтрации в материале нефробиопсий позволяет исключить фактор субъективности, что является важным звеном, как постановки правильного морфологического диагноза, так и необходимым условием проведения научных исследований [14].

2. Выявление в ткани почек выраженной экспрессии гладкомышечного актина- α и фибронектина может служить морфологическим маркером неблагоприятного прогноза. Использование комплексной оценки изменений интерстиция с применением иммуногистохимического метода позволяет определить вероятный прогноз дальнейшего развития заболевания на начальных этапах диагностики и выделить среди детей с первичными гломерулопатиями группу пациентов с высоким риском быстрого развития хронической почечной недостаточности. Выявление предикторов раннего прогрессирования хронических болезней почек позволит своевременно назначить необходимую нефропротекторную терапию и решить вопрос о выборе протокола патогенетической терапии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в научных журналах

1. Клинико-морфологическая характеристика IgA нефропатии у детей и подростков / А.В. Сукало, А.В. Крылова-Олефиренко, Е.Д. Черствый, Т.А. Летковская, Н.И. Тур, В.В. Савош // Педиатрия. – 2009. – № 3. – С. 28–32.
2. Савош, В.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика интерстициальной ткани почек при первичных гломерулопатиях / В.В. Савош, Т.А. Летковская, Е.Д. Черствый // Проблемы здоровья и экологии. – 2009. – № 2. – С. 26–30.
3. Патогенетическое и прогностическое значение тубулоинтерстициальных изменений в прогрессировании некоторых морфологических вариантов гломерулопатий у детей / В.В. Савош, Т.А. Летковская, Е.Д. Черствый, А.В. Сукало, Н.И. Тур // Рецепт. – 2009. – № 4. – С. 105–112.
4. Савош, В.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тубулоинтерстициального компонента при первичных гломерулопатиях в материале пункционных нефробиопсий / В.В. Савош // Медицинская панорама. – 2009. – № 10. – С. 66–68.
5. Клеточные механизмы формирования тубулоинтерстициальных изменений при первичных гломерулопатиях / В.В. Савош, Т.А. Летковская, Е.Д. Черствый, А.В. Сукало // Медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С. 98–100.

Статьи в сборниках научных трудов

6. Савош, В.В. Определение экспрессии гладкомышечного актина-а в интерстициальной ткани почек при различных морфологических типах нефропатий / В.В. Савош // Труды молодых ученых–2007: сборник научных работ. – Минск, 2007. – С. 123–126.
7. Савош, В.В. Изучение молекулярных механизмов развития тубулоинтерстициальных повреждений при гломерулопатиях / / В.В. Савош // Труды молодых ученых–2008: сборник научных работ. Минск, 2008. С. 148–152.

Тезисы докладов и конференций

8. Immunohistochemical Characteristic of Tubulointerstitial Changes in Patients With Primary Glomerulopathies / V.V. Savosh, T.A. Letkouskaya, E.D. Cherstvoy, A.V. Sukalo, N.I. Tur // Virchows Arch. – 2009. – Vol. 455. – P. S405.

9. Савош, В.В. Некоторые патогенетические механизмы формирования интерстициальных изменений при первичных гломерулопатиях / В.В. Савош, Т.А. Летковская, Е.Д. Черствый // Сборник тезисов III съезда Российского общества патологоанатомов. – 2009. – Т. II. – С. 442–444.

10. Савош, В.В. Характеристика тубулоинтерстициальных изменений при первичных гломерулопатиях у детей / В.В. Савош, Т.А. Летковская, Е.Д. Черствый // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии: сборник работ науч.-практ. конф. – 2009. – С. 57–59.

11. Expression of myofibroblasts markers in the renal interstitial tissue in patients with proteinuria / I.A. Kazyra, V.V. Savosh, N.I. Tur, T.A. Letkovskaya, E.D. Cherstviy, A.V. Sukalo // Pediatric Nephrology. – 2008. – Vol. 23. – P. 1642.

12. Савош, В.В. Экспрессия трансформирующего фактора роста- β в интерстициальной ткани почек при первичных нефропатиях у детей. / В.В. Савош, Т.А. Летковская, Е.Д. Черствый // Актуальные вопросы морфологической диагностики заболеваний: материалы Республ. науч.-практ. конф. – Витебск: ВГМУ, 2008. – С. 215–218.

13. Савош, В. В. Структура нефробиопсий у детей / В.В. Савош // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 62-й науч. сессии университета. – Витебск, 2007. – С. 419–423.

Рационализаторское предложение

14. Методики оценки фиброзных и воспалительных изменений в интерстициальной ткани почек в материале нефробиопсий: рационализаторское предложение № 1682 от 09.11.2009 г. / В.В. Савош, Т.А. Летковская, Е.Д. Черствый, С.К. Клецкий.

РЭЗІЮМЭ

Савош Вікторыя Віктараўна

Патагенетычнае і практычныя значэнне тубулаінтэрстыцыяльных змяненняў пры развіцці першасных гламерулапатыў у дзяцей

Ключавыя словы: першасныя гламерулапатыі, інтэрстыцыяльныя змяненні, фіброз, міяфібрабласты, фібранэкцін, калаген IV тыпу.

Мэта даследавання: вызначыць ролю тубулаінтэрстыцыяльных змяненняў пры прагрэсіраванні хранічных захворванняў нырак ў дзяцей на аснове ацэнкі стану экстрацэлюлярнага матрыкса і канальцаў пры розных назалагічных формах першасных гламерулапатыў.

Метады даследавання: светавая мікраскапія, імунагістахімічнае афарбаванне, статыстычны аналіз.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Найбольш значныя змяненні інтэрстыцыя і канальцаў адзначаюцца ў хворых з факальна-сегментарным гламеруласклерозам і мезангіякапілярным гламеруланефрытам і выступаюць ў якасці марфалагічных прэдыктараў хуткага прагрэсіравання хваробы. Рэмадэліраванне інтэрстыцыяльнага матрыкса пры першасных гламерулапатыях характарызуецца павелічэннем колькасці клетак з міяфібрабластычнай дыферэнцыроўкай (у выніку эпітэліяльна-мезенхімальнай трансфармацыі эпітэліяцытаў) і наапаўненнем у экстрацэлюлярным матрыксе калагену IV тыпу і фібранэкціну. Ступень інтэрстыцыяльнага фіброзу нарастае ў дынаміцы развіцця ныркавай хваробы пераважна за кошт павелічэння колькасці фібранэкціну, узмацненне экспрэсіі якога ў спалучэнні са значнай экспрэсіяй гладкамышачнага акціну- α з'яўляюцца імунагістахімічным маркёрам неспрыяльнага прагнозу развіцця хваробы ў пацыентаў з першаснымі гламерулапатыямі. Вызначана павелічэнне экспрэсіі гладкамышачнага акціну- α і трансфарміруючага фактару росту- β у ныркавым інтэрстыцыі ў пацыентаў з нефратычным узроўнем пратэінурыі (больш за 40 мг/кг/сут).

Ступень выкарыстання атрыманых вынікаў. Вызначэнне паказчыка экспрэсіі гладкамышачнага акціну- α і фібранэкціну можа служыць дадатковым марфалагічным маркёрам неспрыяльнага прагнозу і дазволіць вылучыць сярод дзяцей з першаснымі гламерулапатыямі групу пацыентаў з высокай рызыкай хуткага развіцця хранічнай ныркавай недастатковасці, удакладніць крытэрыі выбару патагенетычнай і ныркава-пратэктарнай тэрапіі, а таксама тактыкі вядзення гэтых хворых.

Галіна выкарыстання: паталагічная анатомія, нефралогія.

РЕЗЮМЕ

Савош Виктория Викторовна
Патогенетическое и прогностическое значение
тубулоинтерстициальных изменений в развитии
первичных гломерулопатий у детей

Ключевые слова: первичные гломерулопатии, интерстициальные изменения, фиброз, миофибробласты, фибронектин, коллаген IV типа.

Цель исследования: установить роль тубулоинтерстициальных изменений в прогрессировании хронических заболеваний почек у детей на основании оценки состояния экстрацеллюлярного матрикса и канальцев при различных нозологических формах первичных гломерулопатий.

Методы исследования: световая микроскопия, иммуногистохимическое окрашивание, статистический анализ.

Полученные результаты и их новизна. Наиболее выраженные изменения интерстиция и канальцев отмечаются у больных с фокально-сегментарным гломерулосклерозом и мезангиокапиллярным гломеруло-нефритом и выступают в качестве морфологических предикторов быстрого прогрессирования заболевания. Ремоделирование интерстициального матрикса при первичных гломерулопатиях характеризуется увеличением количества клеток с миофибробластической дифференцировкой (в результате эпителиально-мезенхимальной трансформации эпителиоцитов) и накоплением в экстрацеллюлярном матриксе коллагена IV типа и фибронектина. Степень интерстициального фиброза нарастает в динамике развития почечного заболевания преимущественно за счет увеличения количества фибронектина, усиление экспрессии которого в сочетании с выраженной экспрессией гладкомышечного актина- α являются иммуногистохимическими маркерами неблагоприятного прогноза развития заболевания у пациентов с первичными гломерулопатиями. Отмечено усиление экспрессии гладкомышечного актина- α и трансформирующего фактора роста- β в почечном интерстиции у пациентов с нефротическим уровнем протеинурии (более 40 мг/кг/сут).

Степень использования полученных результатов. Определение показателя экспрессии гладкомышечного актина- α и фибронектина может служить дополнительным морфологическим маркером неблагоприятного прогноза и позволит выделить среди детей с первичными гломерулопатиями группу пациентов с высоким риском быстрого развития хронической почечной недостаточности, уточнить критерии выбора патогенетической и нефропротекторной терапии, а также тактики ведения этих больных.

Область применения: патологическая анатомия, нефрология.

SUMMARY

Savosh Viktoriya

Pathogenetic and prognostic meaning of tubulointerstitial changes in the development of the primary glomerulopathies in children

Key words: glomerulopathy, tubulointerstitial changes, fibrosis, myofibroblasts, fibronectin, collagen IV type.

Purpose of the study: to reveal possible relationships between tubulointerstitial changes and progression of the primary glomerulopathies in children using characteristic of extracellular matrix and renal tubular.

Methods: Light microscopy, immunohistochemical staining, statistic analysis.

Results and the main findings. We have found that focal segmental glomerulosclerosis and membranoproliferative glomerulonephritis were accompanied by the increases of the degree of the tubulointerstitial changes and characterized by poor prognosis. There was an increase in myofibroblasts through epithelial-mesenchymal transition of tubular cells and overexpression of extracellular matrix proteins (collagen type IV and fibronectin) during formation of the interstitial fibrosis. During progression of renal disease the degree of interstitial fibrosis increased due to fibronectin accumulation, we considered high expression of smooth muscle actin and fibronectin to be a marker of unfavorable prognosis for the primary glomerulopathies. Expression of smooth muscle actin and transforming growth factors- β was significantly higher in patients with the nephritic level of proteinuria (more than 40 mg/kg per 24 hours).

Recommendations for usage. The quantitative assessment of fibronectin and smooth muscle actin expression may be useful for prognosis of primary glomerulopathies in children. It can also help to define patients with high risk of rapid chronic renal failure development and specify selection criteria of the choice of pathogenetic treatment.

Area of application: pathology, nephrology.

Подписано в печать 30.03.10. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,16. Уч.-изд. л. 1,22. Тираж 60 экз. Заказ 164.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

ЛП № 02330/0150484 от 25.02.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.