

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ПРЕДИКТОРОВ ФИБРОЗА У БОЛЬНЫХ IgA-И МЕМБРАНОЗНОЙ НЕФРОПАТИЕЙ

Сиповский В. Г., Сиповская Е.Б.

ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, 197022, Российская

Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8, sipovski@mail.ru

ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, ул.

Аккуратова, д. 2

Резюме

Целью настоящей работы было сравнительное исследование стромальных и клеточно-молекулярных маркеров фибропластических процессов в тубулоинтерстиции почек у пациентов с IgA- и мембранозной нефропатией (МН). Для патогистологического исследования препараты окрашивались стандартными окрасками. Изменения анализировались полуколичественно. Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием поликлональных и моноклональных антител к α -SMA, CD34 (Dako). Статистическую обработку полученных данных проводили с применением стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica 8.0 for Windows) методами параметрической и непараметрической статистики.

В результате количественного и полуколичественного исследования патоморфологических стромально-сосудистых параметров в группах больных было установлено, что склероз клубочков был достоверно существеннее у больных с IgA-нефропатией (IgAN). Количество гладкомышечных клеток в тубулоинтерстиции, перитубулярных капилляров (РТС) и относительный объем тубулярного эпителия напротив был существенно меньше, чем у пациентов страдавших МН. Внутригрупповой корреляционный анализ больных при IgAN выявил достоверные связи между площадью склероза паренхимы и склерозом клубочков ($r = 0,47, p < 0,05$), коэффициентом обструкции артерий и количеством РТС ($r = -0,37, p < 0,05$). Внутригрупповой корреляционный анализ больных при МН выявил достоверные связи между площадью эпителия со склерозом клубочков ($r = 0,47, p < 0,05$), количеством гладкомышечных клеток и РТС ($r = -0,46, p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют, о том что ряд стромально-сосудистых маркеров паренхимы почки документировали ремоделирование кровотока ТИН при IgAN и МН, а так же взаимосвязь фибротических процессов в ТИН с активностью α -SMA-позитивных миофибробластов.

Ключевые слова: IgA-нефропатия, мембранозная нефропатия, миофибробласты, тубулоинтерстиций, микрососуды, CD34, SMA, склероз

**COMPARATIVE STRUCTURAL AND MOLECULAR ANALYSIS FIBROTIC
PREDICTORS OF PATIENTS WITH IGA AND MEMBRANOUS NEPHROPATHIES.**

Sipovskii V.G., Sipovskaya E.B.

*FSBEI HE I.P. Pavlov SPbSMU MOH Russia, 197022 Russian Federation, Sankt-Petersburg, lev
Tolstoy str. bld 6-8, sipovski@mail.ru*

*FSBI «SMRC V.A.. Almazova» MOH Russia, 197341, Russian Federation, Sankt-Petersburg,
Acuratova str., bld. 2*

Abstract

The purpose of this work was a comparative study of stromal and molecular markers of fibroplastic processes in renal tubulointerstitium (TIN) in patients with IgA-nephropathy (IgAN) and membranous nephropathy (MN). For histopathological examination, the slides were colored by standard stains. Histopathological changes were assessed semi-quantitatively. Immunohistochemical study was performed using polyclonal and monoclonal antibodies to α -SMA, CD34 (Dako). Statistical processing of the data was performed using standard software packages of applied statistical analysis (Statistica 8.0 for Windows). Standard methods of parametric and non-parametric statistics were used. The quantitative and semi-quantitative studies of pathological parameters in the groups of patients revealed the fact that sclerosis of the glomeruli was significantly more significant in patients with IgAN. While the quantity of smooth muscle cells in TIN (SMA+), peritubular capillaries (PTC) and the volume of the tubular epithelium were significantly less in comparison with patients with MN. Intra-group correlation analysis of patients with IgAN revealed reliable links between the volume of sclerosis of TIN and quantity of sclerotic glomeruli ($r = 0.47$, $p < 0.05$), the coefficient of artery obstruction and quantity of PTC ($r = -0.37$, $p < 0.05$). Intra-group correlation analysis of patients with MN revealed significant links between the volume of epithelium and glomerulosclerosis ($r = 0.47$, $p < 0.05$), quantity of smooth muscle cells in TIN and PTC (CD34 +) ($r = -0.46$, $p < 0.05$). The obtained data indicates that some stromal and vascular markers of the kidney parenchyma documented the remodeling of the TIN blood flow in IgAN and MN. And it showed the relationship fibrotic processes in TIN with the activity of α -SMA-positive myofibroblasts.

Key words: IgA nephropathy, membranous nephropathy, myofibroblasts, tubulointerstitium, capillaries, CD34, SMA, sclerosis.

Введение.

В прогрессировании хронических нефропатий тубулоинтерстициальный (ТИН) фиброз имеет ведущее значение [1,2]. На настоящий момент известны различные механизмы склерозирования и прогрессии склероза ТИН [3 ,4] , одним из которых является гемодинамический фактор. Однако комплексная оценка сосудистого русла у пациентов с различными гломерулопатиями мало исследовалась[5]. Основное внимание уделялось состоянию перитубулярных капилляров [6]. Отдельные работы были посвящены исследованию более крупных сосудов, например внутриорганных артерий разного калибра [7].

Цель.

Целью настоящей работы было сравнительное исследование стромально-сосудистых и клеточно-молекулярных маркеров фибропластических процессов в ТИН почек у пациентов с IgA и мембранозной нефропатиями, а так же анализ взаимосвязей этих изменений в ТИН между собой.

Материалы и методы.

В исследуемые группы вошли 60 пациентов: IgA – нефропатия (n=30) (IgAN), мембранозная нефропатия (МН) (n=30), мужчин – 33, женщин-27 (средний возраст 43-45 лет). Больные с пурпурой Шенляйн-Геноха, Системной красной волчанкой, с НВС/НВУ ассоциированными гломерулонефритами не были включены. Все пациенты имели подтвержденный морфологически диагноз, классифицированный в соответствии с ICD 10 . Для патогистологического исследования фрагменты почечной паренхимы фиксировались в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (рН 7,4), в течение 24 ч, при комнатной температуре. После стандартной обработки тканевых фрагментов (обезвоживание, пропитка, заливка) из парафиновых блоков были приготовлены 3-4 мкм серийные срезы. Препараты окрашивались гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа, по Массону, серебрением по Джонсу, Конго-красным. Анализ патогистологических изменений: очагового склероза, периваскулярного склероза, склерозированных клубочков проводился полуколичественно. В зависимости от степени выраженности патологических изменений в процесс ранжировался следующим образом: 0 – отсутствие патологических изменений, 1- до 25% объема паренхимы, 2-до 50% объема паренхимы, 3- более 50% объема паренхимы. Склероз клубочков (глобальный гломерулосклероз + сегментарный склероз клубочков) определялся как “%” склерозированных клубочков от общего числа клубочков в исследованных срезах. При необходимости определялось среднее значение критерия (М) и ошибка средней (m) в

группе. Количественное определение относительного объема тубулярного эпителия и соединительной ткани ТИН определялась с использованием 100 точечной сетки Вейбеля в 10 полях зрения при увеличении объектива $\times 20$. Артерии диаметром более 100 мкм анализировались посредством определения коэффициента обструкции – деления длины внутреннего диаметра сосуда (до субэндотелиальной базальной) мембраны на внешний диаметр сосуда (до внешней границы средней оболочки). Иммунофлуоресцентное исследование (прямая флуоресценция) осуществлялась на криостатных срезах с использованием FITC меченых антител, производство DAKO (Дания). Во всех биопсиях анализировалась депозиция в структурах нефрона IgA, IgM, IgG, C3c, C1q, фибриногена, каппа и лямбда легких цепей. Иммуногистохимическое исследование проводилось на парафиновых срезах толщиной 4 мкм. Поликлональные и моноклональные антитела к α -SMA (Dako, клон 1A4), CD34 (Dako) были применены в качестве иммуноморфологических молекулярных маркеров. Полимерную систему детекции EnVision (DAKO) использовали для визуализации эпитопов. Изучение патоморфологических изменений проводилось в светооптическом микроскопе Carl Zeiss Imager Z 2 (Германия). Оценка активности миофибробластов проводилась путем подсчета SMA-позитивных клеток в 20 полях зрения ТИН при увеличении объектива 40. Для анализа плотности микроциркуляторного русла коры почечной паренхимы, в 20 не перекрещивающихся полях зрения на увеличении 40 с использованием 100 точечного счета на каждое поле зрения анализировался CD34. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica 8.0 for Windows). Использовались стандартные методы параметрической и непараметрической статистики. Данные в таблицах представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения в случаях правильного распределения. Для сравнительного анализа между группами использовали тесты Kruskal-Wallis и Mann –Whitney U Test при $p \leq 0,05$, соответственно корреляционный анализ посредством Spearman Rank order Correlations с вычислением коэффициента “r” при $p < 0,05$.

Результаты.

При светооптическом исследовании выявлялись, уже признанные “классическими”, патоморфологические признаки IgAN: мезангиальная гиперклеточность и увеличение мезангиального матрикса. Степень выраженности этих патоморфологических изменений варьировала как по количеству клеток в мезангии, так и по распространенности. Склероз ТИН, был очаговый и заместительный, сопровождая атрофией канальцев соответствующей зоны и незначительной лейкоцитарной инфильтрацией. МН

характеризовалась различной степени выраженности склеротическими изменениями клубочков в виде диффузного утолщения базальных мембран, с формированием так называемых ”шипиков” при 2 стадии и “сотовых” структур при 3 ст., расширением мезангиального матрикса, склерозом клубочков и ТИН в виде диффузного межтубулярного склероза.

Иммуногистохимический продукт реакции на α - SMA в виде темно-коричневых или черных гранул (ДАБ-реакция) располагался в цитоплазме клеток межтубулярного интерстиция -миофибробластах, гладкомышечных клетках артерий и мезангиоцитах мезангиального матрикса гломерул (рисунок 1А). Частично и в незначительном количестве α – SMA располагался в основном веществе интерстиция в виде низко интенсивного продукта реакции мелкогранулярного характера.

CD34 выявлялся в цитоплазме эндотелиоцитов в виде мелкогранулярного продукта реакции коричневого цвета. Продукт реакции маркировал все виды сосудов паренхимы почки, начиная с капилляров клубочков, ТИН и заканчивая аркадными артериями, выстилая их просвет в месте расположения эндотелиоцитов (рисунок 1Б). Количество и размер микрососудов варьировал в зависимости от изменений в структуре паренхимы, в частности выраженности склеротических и атрофических процессов ТИН.

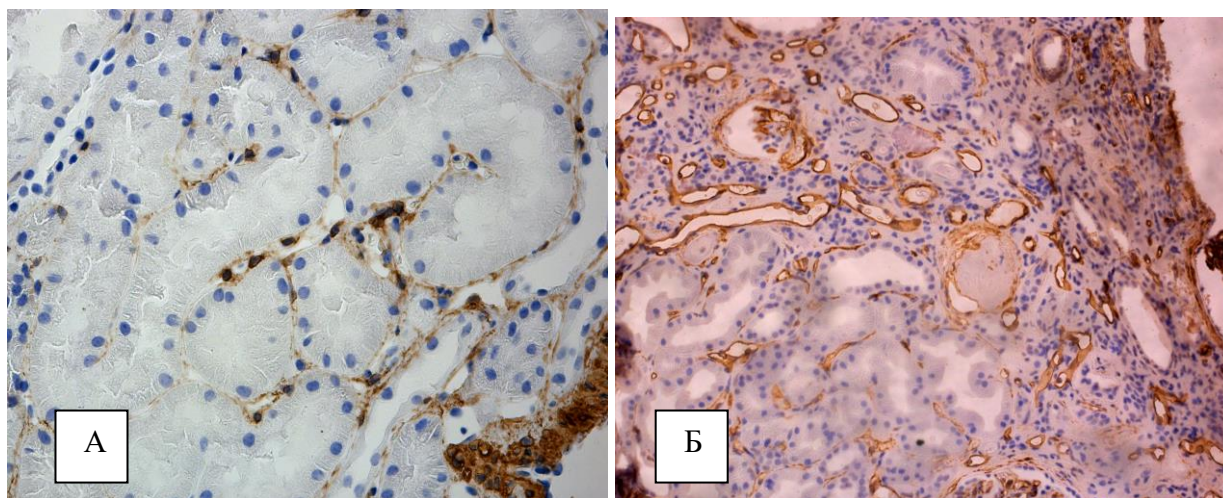


Рисунок 1.

А – Микрофотограмма больного А. с мембранозной нефропатией. Миофибробласты (SMA+) в ТИН паренхимы почки и стенках артерий SMA. Увеличение 40.

Б - Микрофотограмма больного Б. с IgA-нефропатией. Перитубулярные капилляры (CD34+) в ТИН паренхимы почки. Увеличение 40.

Обзорная микроскопия склеротических изменений клубочков и ТИН показала, что гломерулосклероз и фиброзирование ТИН имели умеренный характер и располагались в основном в кортикальной зоне. Атрофия канальцев сопровождалась уплощением

эпителия, утолщением базальной мембраны и изменением их размеров. Обструкция или сужение просвета артерий среднего калибра ($>100\mu\text{м}$) сопровождалась фиброплазией интимы с частичным истончением мышечного слоя артерий. При сравнительном анализе количественных и полуколичественных данных (таблица 1.) существенных различий между группами по коэффициенту обструкции артерий и площади очагового склероза не отмечалось. При этом различия между группами больных касались таких маркеров как склероз клубочков, количество микрососудов, миофибробластов и площади эпителия. Склероз клубочков был достоверно существеннее у больных с IgA-нефропатией, тогда как количество гладкомышечных клеток в ТИН, перитубулярных капиллярах и относительный объем тубулярного эпителия был существенно меньше по сравнению с пациентами страдавшими МН.

Таблица 1. Результаты сравнительного анализа стромально-сосудистых и клеточно-молекулярных маркеров среди пациентов с IgA и мембранозной нефропатиями.

	эф. обструкции	склероз клубочков	Плотность ГС	Миофибро- бласты	Объем эпителия	Объем ромы
И (n=30)	$0,50\pm 0,14$	$0,16\pm 0,16$	$10,45\pm 2,54$	$21,24\pm 8,67$	$2,25\pm 3,1$	$1,25\pm 2,08$
AN (n=30)	$0,56\pm 0,13$	$0,32\pm 0,21$	$7,7\pm 2,33$	$3,88\pm 6,52$	$5,35\pm 4,71$	$11,32\pm 4,73$

Корреляционный анализ документировал взаимосвязь между относительным объемом соединительной ткани и склерозом клубочков ($r = 0,47$, $p < 0,05$), коэффициентом обструкции и плотностью микроциркуляторного русла ($r = -0,37$, $p < 0,05$) при IgAN. Внутригрупповой корреляционный анализ выявил достоверные связи между относительным объемом тубулярного эпителия и склерозом клубочков ($r = 0,47$, $p < 0,05$), активностью миофибробластов и плотностью капилляров ($r = -0,46$, $p < 0,05$) у пациентов с МН. Среди остальных параметров достоверных корреляционных взаимосвязей не было обнаружено.

Обсуждение.

Ряд морфометрических показателей был использован нами для характеристики фибротических изменений паренхимы [6]. Один из них – коэффициент обструкции является ориентировочный аналогом сосудистого индекса (СИ), разработанного

В.В.Серовым и др. в 1993. Несмотря на простоту метода, он оказался вполне информативным. По результатам исследования была выявлена достоверная отрицательная зависимость коэффициента обструкции с плотностью микрососудов (CD34+) – маркера МЦР у больных с IgAN. Известно, что CD34 это трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 110 КД экспрессирующийся на поверхности лимфоидных, гемопоэтических прогениторных клеток, а так же в эндотелии сосудов позволяет оценивать плотность микроциркуляторного русла ТИН [8]. Полученный факт на наш взгляд, свидетельствует о ремодуляции почечного кровотока, в частности МЦР и артерий среднего калибра. При сужении магистральных артерий по-видимому происходит увеличение количества капилляров в ТИН, что сопровождается снижением функции почки при IgAN. Поскольку изменение гемоциркуляции любого органа взаимосвязано с состоянием интерстиция была изучена активность миофибробластов (“ α -SMA +” клеток ТИН). Иммуногистохимическое определение SMA-позитивных клеток позволило нам определить источник фибропластического процесса, поскольку высокая экспрессия α -SMA отражает количество миофибробластов и степени выраженности фиброза [9]. При этом α -SMA является микрофиламентозным актином, находящемся в миофибробластах, которые секретируют внеклеточный матрикс [10,11]. CD34 и SMA имеют по результатам нашего исследования достоверную корреляционную зависимость в группе больных с МН и не достоверную при IgAN, что соответственно свидетельствует о связи активности профибротических факторов, которые могут сочетаться с ремодуляцией кровотока. Эти данные находятся в полном контексте общих представлений о том, что почечный фиброз характеризуется деструкцией нормальной ткани с последующей ремодуляцией почечной паренхимы характеризующейся накоплением избытка внеклеточного матрикса и соединительнотканых волокон [12], в том числе и при гипертензивном синдроме [14]. В то же время активация миофибробластов при МН свидетельствует о том, что этот процесс, по-видимому, является универсальным и может быть связан не только с гемодинамическим фактором. О чем косвенно свидетельствует корреляционная связь у пациентов при IgAN между склерозом клубочков и площадью стромы, а при МН склерозом клубочков с площадью эпителия.

В результате наших исследований установлено, что экспрессия α -SMA в группе IgAN и МН была локализована преимущественно в зонах склерозирования ТИН. При этом по результатам корреляционного анализа количество миофибробластов имело прямую положительную взаимосвязь с выраженностью склероза, что подтверждает общеизвестные литературные данные [10]. Происхождение миофибробластов при

патологических состояниях остается неясным. Наиболее часто предполагается, что они дифференцируются из местных резидентных фибробластов. Недавно, были получены свидетельства, того что эти клетки могут также происходить из тубулярных эпителиальных клеток с помощью процесса, известного как эпителиально-мезенхимальная трансформация [13]. Считается, что в ответ на повреждение тканей почек интерстициальные фибробласты и тубулярные эпителиальные клетки меняют свой фенотип и становятся α -SMA-позитивными миофибробластами, которые синтезируют внеклеточный матрикс [14,15].

Выводы.

Таким образом, проведенный анализ ряда стромально-сосудистых маркеров паренхимы почки документировал ремоделирование кровотока ТИН при IgAN и МН, так же показал взаимосвязь фибротических процессов в ТИН с активностью α -SMA-позитивных миофибробластов.

Литература.

1. Bohle, A. On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium [Text] / A.Bohle , F.Strutz , G.A.Müller // Exp Nephrol.- 1994.-Vol.2.- №4.-P.205-210.
2. Chen, Y. Pathological predictors of renal outcomes in nephrotic idiopathic membranous nephropathy with decreased renal function [Text] / Y.Chen , L. Tang , Z. Feng et al.// J Nephrol. -2014.-Vol.27.-№ 3.-P.307-316.
3. Nangaku, M. Mechanisms in remodeling of the kidney[Text] / M.Nangaku, T.Myata.// Nihon Rinsho- 2008 -Vol.66. -№ 9.-P.1696-1700.
4. Meyrier, A. Nephrosclerosis: update on a centenarian [Text] /A.Meyrier //Nephrol. Dial. Transplant.- 2015.-Vol.30.- №11.-P.1833-1841.
5. Сиповский, В.Г.Морфофункциональная характеристика тубулоинтерстиция у больных с IgA нефропатией[Текст]/ В.Г.Сиповский, Р.В.Зверьков,А.В.Смирнов// Артериальная гипертензия.- 2015.-Т.21.-№5.- С. 514-521.
6. Fine, L.G. Chronic hypoxia as mechanism of progression of chronic kidney disease: from hypothesis to novel therapeutics[Text] / L.G. Fine, J.T.Norman // Rudney International.-2008.-Vol.4.-P.867-872.
7. Семенов, Д.В. Доплерографическая оценка артериального кровотока и изменение функции почек у больных атеросклерозом почечных артерий после реваскуляризации [Текст] / Д.В. Семенов,А.В. Смирнов, Е.В.Кирилова и др.. // Нефрология. – 2012. – №1. – С. 45-52.

- 8.** Masum, M.A. Local CD34-positive capillaries decrease in mouse models of kidney disease associating with the severity of glomerular and tubulointerstitial lesions[Text] / M.A.Masum, O.Ichii , Y.H.A.Elewa et al.// BMC Nephrol.- 2017.-Vol18.-№1.-P.280
- 9.** Alexopoulos, E. Predictors of outcome in idiopathic rapidly progressive glomerulonephritis (IRPGN) [Text] / E.Alexopoulos, L. Gionanlis , E.Papayianni et al. // BMC Nephrol. -2006.-Vol.7.-P.6.
- 10.** Strutz, F. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease[Text] / F .Strutz F, M .Zeisberg // J. Am. Soc. Nephrol.-2007.-Vol.17.-P.2992-2998.
- 11.** He F.F. Inhibition of SIRT2 Alleviates Fibroblast Activation and Renal Tubulointerstitial Fibrosis via MDM2[Text] /F.F.He , R.Y.You , C.Ye et al//Cell. Physiol Biochem.- 2018.-Vol.46.-№2.-P.:451-460
- 12.** Peng Sheng-Nan. Protection of rhein on IgA nephropathy mediated by inhibition of fibronectin expression in rats[Text] / Peng Sheng-Nan, Zeng Hui-Hong, Zhu Qing-Xian// Indian J. Pharmacol.-2103.-Vol.45.-№2.- P.174-179.
- 13.** Kizu, A. Endothelial-mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during diabetic nephropathy[Text] / A .Kizu, D .Medici, R. Kalluri// Am .J. Pathol. -2009.-Vol.175.-P.1371–1373.
- 14.** Minz, R. Role of myofibroblasts and collagen type IV in patients of IgA nephropathy as markers of renal dysfunction[Text] / R .Minz, A. Bakshi, S. Chhabra et al.// Indian J. Nephrol.- 2010 -Vol.20. -№ 1.-P.34-39.
- 15.** Qi F.H. Adenovirus-mediated P311 ameliorates renal fibrosis through inhibition of epithelial-mesenchymal transition via TGF- β 1-Smad-ILK pathway in unilateral ureteral obstruction rats[Text]/ F.H.Qi, P.P.Cai , X.Liu et al.// Int. J. Mol. Med. -2018.-Vol.41.-№5.-P.3015-3023