

Механизмы и предикторы прогрессирования гломерулопатий у детей и подростков

Белорусский государственный медицинский университет

Необратимое снижение функции почек при гломерулопатиях происходит с развитием склероза, в большей степени интерстициального. Важную роль в прогрессировании гломерулопатий играют миофибробласты. Экспрессия гладкомышечного актина альфа (маркера миофибробластов) в ткани почек является ранним признаком формирования интерстициального фиброза

Ключевые слова: дети, гломерулопатии, миофибробласты, прогноз

Прогнозирование течения гломерулопатий является актуальным вопросом нефрологии. Известны относительно доброкачественные варианты первичных гломерулопатий, при которых функция почек длительно остается сохранной, но описаны также и варианты с неблагоприятным течением и быстрым прогрессированием до терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН). Однако такое разделение имеет ограниченную ценность, так как характеризует прогноз заболевания в целом, индивидуальный же прогноз остается сложным и непредсказуемым. Вместе с тем именно прогноз заболевания у конкретного пациента является вопросом, который встает перед нефрологом в повседневной практике.

Установлены отдельные клинические и морфологические признаки, которые ассоциируются с неблагоприятным прогнозом различных гломерулопатий. Так, при IgA нефропатии позднее начало заболевания, персистирующие гипертензия и протеинурия, а также снижение скорости клубочковой фильтрации в дебюте заболевания признаны факторами, которые свидетельствуют о высокой вероятности необратимого снижения функции почек. При нефротическом синдроме неблагоприятными прогностическими факторами являются поздняя манифестация, стероидрезистентность, наличие гематурии и гипертензии. Однако даже при известном неблагоприятном прогнозе скорость прогрессирования заболевания у конкретного пациента может варьировать в широких пределах.

Среди морфологических факторов большую прогностическую ценность имеет обнаружение склеротических изменений в ткани почек. В исследованиях на животных и у людей при проведении повторных нефробиопсий показана возможность регрессии гиперклеточности клубочков, расширения мезангиального матрикса и даже гломерулосклероза [1,7]. В случае гломерулярных поражений необратимое снижение функции почек происходит при присоединении тубуло-интерстициальных изменений, в первую очередь интерстициального склероза и атрофии канальцев. Именно интерстициальный склероз наряду с клиническими факторами является независимым предиктором развития ХПН при различных вариантах поражения клубочков [4].

Многие неблагоприятные клинические факторы могут являться с одной стороны признаками прогрессирования поражения почек, с другой стороны они сами его провоцируют и ускоряют. Так, например, протеинурия является признаком повышенной проницаемости гломерулярного фильтра вследствие повреждения подоцитов и дальнейшего склероза гломерул. Доказана самостоятельная роль протеинурии в прогрессировании склеротических изменений ткани почек [19,18]. При

высокой проницаемости гломерулярного фильтра в мочу поступают цитокины, компоненты комплемента, окисленные белки, которые непосредственно повреждают тубулярный эпителий, а также активируют провоспалительные и профибротические хемокины, индуцируя интерстициальное воспаление, в первую очередь макрофагальное. Как правило, в большинстве случаев альбумин не оказывает прямого повреждающего действия на эпителиоциты канальцев, что объясняет благоприятный прогноз в отношении почечной выживаемости у пациентов с НСМН, при котором протеинурия преимущественно селективная. Артериальная гипертензия является отражением склероза почечной ткани и активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС). Гемодинамические изменения при артериальной гипертензии ведут к гиперфильтрации и повышению капиллярного давления в гломерулах, усиливают протеинурию и провоцируют дальнейшее прогрессирование склероза.

Роль РААС в прогрессировании гломерулосклероза и интерстициального склероза была установлена на основании эффективности применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) и других ее компонентов (рецепторов ангиотензина) при хронической почечной недостаточности. иАПФ ведут к преимущественному расширению эфферентной артериолы, что снижает гломерулярное капиллярное давление. Механизмы этого действия включают как блокирование эффектов ангиотензина II, так и усиление эффектов брадикинина, который в норме разрушается ангиотензин-превращающим ферментом. Блокаторы рецепторов ангиотензина I типа не имеют этих эффектов, однако тем не менее было показано, что терапия как иАПФ, так и блокаторами рецепторов ангиотензина I типа приводит к замедлению скорости прогрессирования хронической почечной недостаточности [14]. В исследованиях на экспериментальных моделях и у пациентов с хронической болезнью почек показано, что наилучшие результаты отмечаются при комбинированной терапии иАПФ и блокаторами рецепторов ангиотензина I типа [15].

Неблагоприятные эффекты ренина включают как активацию РААС, так и самостоятельные эффекты. Показана активность рецепторов ренина на мезангиоцитах [2].

Потенцирование склеротических изменений в ткани почек при активации РААС во многом связано с прямыми эффектами ангиотензина II. Ангиотензин II усиливает миграцию эндотелиоцитов, а также гладкомышечных клеток сосудов, вызывает гипертрофию и гиперплазию мезангиоцитов и гладкомышечных клеток [22]. Все компоненты системы ренина и ангиотензина присутствуют в макрофагах, которые поэтому могут выступать как дополнительный источник ангиотензина II. Ангиотензин II также индуцирует другие факторы роста, например трансформирующий фактор роста β (TGF- β), ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI-1), которые могут усиливать фиброз [17].

Альдостерон провоцирует почечный фиброз не зависимо от его эффектов на водно-солевой баланс (задержка соли) и гемодинамику (повышение артериального давления). Альдостерон усиливает индукцию ангиотензином PAI-1, а также оказывает прямой эффект на фиброз. С другой стороны, применение антагонистов рецептора альдостерона (спиронолактон) снижает повреждение почек [5].

Многие цитокины и факторы роста участвуют в прогрессировании склеротических изменений в ткани почек. Была показана роль TGF- β , PAI-1,

тромбоцитарного фактора роста (PDGF), эндотелинов, различных хемокинов, ангиотензина II и других в развитии склероза.

PAI-1 в интерстиции влияет на клеточную миграцию, стимулирует эпителиально-мезенхимальное превращение (ЭМТ), в клубочках его просклеротические эффекты в первую очередь связаны с воздействием на обмен внеклеточного матрикса [3].

TGF- β усиливает синтез внеклеточного матрикса и является ключевым фактором, провоцирующим фиброз. TGF- β может стимулировать приобретение подоцитами фенотипа фибробластов, при котором они теряют маркеры дифференцировки и *de novo* экспрессируют гладкомышечный актин альфа (α -SMA). На экспериментальных моделях показано, что в низких дозах TGF- β ингибирует рост и дифференцировку подоцитов, в то время как в высоких дозах вызывает апоптоз подоцитов [23].

Гибель подоцитов играет важную роль в развитии гломерулосклероза. Подоциты участвуют в синтезе внеклеточного матрикса, а также поддерживают нормальную проницаемость гломерулярного фильтра. В обычных условиях подоциты продуцируют эндогенную гепарино-подобную субстанцию, которая ингибирует рост мезангиоцитов, а также являются важным источником ангиопоэтина-1 и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). В норме пролиферативная активность подоцитов очень низкая. Поэтому повреждение их ведет ко многим эффектам, включающим нарушение ангиогенеза, сосудистой проницаемости, пролиферацию мезангиоцитов, а также экссудации белков плазмы крови, что ведет к появлению синехий и склерозу [9].

Инфильтрация макрофагами играет важную роль в развитии гломерулосклероза и интерстициального фиброза. Макрофаги продуцируют большое число цитокинов, участвующих в фиброгенезе [10]. При макрофагальной инфильтрации отмечается локальная активация TGF- β .

Прогрессирование гломерулосклероза характеризуется увеличением внеклеточного матрикса в большей степени, чем гиперклеточности, в то время как интерстициальный склероз преимущественно характеризуется увеличением числа и объема клеток до того, как отмечается значительное накопление коллагена [11]. Считают, что эти интерстициальные клетки представлены преимущественно миофибробластами, которые являются основными источниками синтеза коллагена. Маркером миофибробластов является экспрессия α -SMA. Источник миофибробластов в интерстиции почек остается дискуссионным. Наиболее вероятным считают генерацию интерстициальных миофибробластов в процессе ЭМТ из канальцевого эпителия. *In vitro* показано, что эпителиальные клетки различных тканей, включая клеточные линии канальцевого эпителия почек, могут проходить ЭМТ, в процессе которой они перестают экспрессировать цитокератин, теряют молекулы адгезии и апикально-базальную полярность, становятся продолговатыми и приобретают способность к инвазии, а также *de novo* экспрессируют фибробласт-специфический протеин-1 (FSP-1) и гладко-мышечный актин альфа [6,20,21]. Эти клетки вероятно мигрируют в интерстиций в качестве миофибробластов. Окружающий матрикс и базальная мембрана канальцев разрушаются путем локального протеолиза, который стимулируют различные цитокины и факторы роста, включающие инсулиноподобные факторы роста I и II, интегрин-связанные киназы, EGF, FGF-2, TGF- β и другие [16]. Также описаны факторы, которые могут ингибировать ЭМТ, например фактор роста гепатоцитов и костный морфогенетический фактор-7, которые таким

образом ингибируют фиброз в экспериментальных моделях хронической болезни почек [16].

Многие авторы сообщают о прогностическом значении экспрессии α -SMA в интерстиции почек, в связи с корреляцией ее с фиброзом интерстиция и последующим нарушением функции почек [8,12,13]. Меньше сведений в доступной литературе о значении мезангиальной экспрессии α -SMA. У детей подобные исследования единичны.

Целью данного исследования явилось исследование экспрессии α -SMA в ткани почек у детей и подростков с различными вариантами первичных гломерулопатий.

Материал и методы

У 61 пациента с различными вариантами первичных гломерулопатий на архивном и текущем материале нефробиопсий проведено исследование экспрессии гладкомышечного актина альфа (α -SMA) в мезангии и интерстиции. В таблице 1 представлено распределение пациентов по клиническим формам и морфологическому диагнозу. Медиана по возрасту на момент проведения нефробиопсии составила 12 лет (2-17 лет). Медиана по длительности наблюдения от момента появления первых симптомов до проведения нефробиопсии составила 24 месяца (1 – 192 месяца). Мальчиков было 28, девочек 33.

Таблица 1. Характеристика пациентов исследованной группы

Характеристика		Число случаев	%
Клинический синдром	Гематурия, в том числе рецидивирующая макрогематурия	40	65,6
	Нефротический синдром, гормонозависимость или гормонорезистентность	11	18,0
	Нефротический синдром с гематурией и/или гипертонзией	4	6,6
	Изолированная протеинурия	6	9,8
Морфологическое заключение	Не-IgA мезангио пролиферативный гломерулонефрит	21	34,4
	IgA нефропатия	23	37,7
	Мембранознопролиферативный гломеруло-нефрит	3	4,9
	НСМН	8	13,1
	ФСГС	5	8,2
	ОГ-1, продуктивная фаза	1	1,6

Мы провели иммуногистохимическое окрашивание нефробиоптатов с коммерческими мышиными anti-human SMA (DAKO Cytomation, Denmark) с использованием стандартной пероксидазной методики. Для визуализации применялся EnVision (DAKO Cytomation, Denmark). В качестве хромогена использовался диаминобензидин (DAB), с последующим докрасиванием препарата гематоксилином Майера. В каждом случае проводились серийные снимки препаратов, которые в дальнейшем подвергались морфометрии. У каждого пациента определялись число α -SMA позитивных и α -SMA негативных клеток во всех клубочках, оценивалась выраженность интерстициальной и перигломерулярной экспрессии α -SMA (отсутствует или следовая 0, слабая 1, умеренная 2, выраженная 3), а также рассчитывались среднее число α -SMA позитивных клеток в клубочке, процент α -SMA позитивных клеток в каждом клубочке, средний процент α -SMA позитивных клеток в клубочке.

Результаты и обсуждение

У пациентов разных клинических групп не было отмечено достоверных различий мезангиальной и интерстициальной экспрессий α -SMA. При этом даже в рамках одной и той же группы экспрессия α -SMA варьировала в значительных пределах.

Средний процент α -SMA позитивных клеток/клубочек, интерстициальная и перигломерулярная экспрессия α -SMA были достоверно выше (Mann-Whitney тест) у

пациентов с IgA нефропатией, чем с не-IgA мезангиопролиферативным гломерулонефритом (МзПГН) ($p < 0,05$). Полученные данные могут свидетельствовать о более неблагоприятном прогнозе IgA-нефропатии у детей и подростков по сравнению с не-IgA мезангиопролиферативным гломерулонефритом.

Мы провели корреляционный анализ (коэффициент корреляции Спирмена) мезангиальной и интерстициальной экспрессии α -SMA у детей и подростков с такими известными неблагоприятными прогностическими факторами, как уровень протеинурии, артериальная гипертензия в дебюте и на момент проведения нефробиопсии, нарушение функции почек в дебюте заболевания, а также морфологическими изменениями – выраженностью и распространенностью мезангиальной пролиферации, наличием интерстициальной инфильтрации, гломерулосклероза и интерстициального склероза (табл. 2).

Таблица 2. Корреляция мезангиальной и интерстициальной экспрессии α -SMA с некоторыми клиническими и морфологическими признаками

Признак		Экспрессия α SMA		
		Перигло- мерулярная	Интерсти- циальная	% α SMA позитивных клеток/клубочек
Уровень креатинина	Rho Спирмена	0,284	0,325*	0,182
	p	0,039	0,017	0,193
Протеинурия max	Rho Спирмена	0,068	0,422*	0,056
	p	0,658	0,004	0,713
Протеинурия средняя	Rho Спирмена	0,041	0,410*	0,024
	p	0,791	0,005	0,875
Дебют	Rho Спирмена	0,155	0,186	0,091
	p	0,238	0,154	0,490
Нарушение функции почек в дебюте	Rho Спирмена	0,044	0,061	-0,163
	p	0,743	0,644	0,219
Повышение АД в дебюте	Rho Спирмена	0,183	0,097	0,149
	p	0,161	0,463	0,257
Наличие эпизодов макрогематурии	Rho Спирмена	0,252	0,215	0,041
	p	0,054	0,103	0,759
Сохраняющаяся активность процесса на момент нефробиопсии	Rho Спирмена	0,347*	0,368*	0,132
	p	0,007	0,004	0,315
Повышение АД на момент нефробиопсии	Rho Спирмена	0,129	0,196	-0,032
	p	0,328	0,133	0,911
Нарушение функции почек на момент нефробиопсии	Rho Спирмена	0,214	0,300*	0,016
	p	0,100	0,020	0,905
Выраженность мезангиальной пролиферации	Rho Спирмена	0,361*	0,316*	0,187
	p	0,005	0,015	0,157
Характер мезангиальной пролиферации	Rho Спирмена	0,145	0,182	0,173
	p	0,276	0,171	0,195
Распространенность мезангиальной пролиферации	Rho Спирмена	0,327*	0,250	0,132
	p	0,012	0,059	0,323
Гломерулосклероз	Rho Спирмена	-0,047	0,027	-0,091
	p	0,729	0,838	0,498
Интерстициальный склероз	Rho Спирмена	-0,169	-0,025	-0,181
	p	0,204	0,854	0,174

*-статистически достоверная корреляционная взаимосвязь ($p < 0,05$).

Выявлена достоверная положительная корреляционная взаимосвязь интерстициальной экспрессии α -SMA и уровнем креатинина, нарушением функции почек на момент нефробиопсии, уровнем протеинурии, активностью процесса, мезангиальной экспрессией α -SMA. Следует отметить, что корреляционная взаимосвязь между интерстициальной экспрессией α -SMA и интерстициальным склерозом отсутствовала. Полученные результаты позволяют предположить, что определение интерстициальной экспрессии α -SMA является чувствительным методом диагностики тубуло-интерстициального повреждения у детей и подростков на ранних этапах фиброгенеза при различных вариантах первичного гломерулонефрита.

Перигломерулярная экспрессия α -SMA коррелировала (положительная достоверная корреляционная связь) с сохраняющейся активностью процесса, а также выраженностью и распространенностью мезангиальной пролиферации. Достоверная корреляционная взаимосвязь мезангиальной экспрессии α -SMA с исследованными признаками отсутствовала.

Выводы

1. Выявлены достоверные различия мезангиальной, интерстициальной и перигломерулярной экспрессии α -SMA между пациентами с IgA-нефропатией и не-IgA МзПГН.
2. Установлена достоверная взаимосвязь интерстициальной экспрессии α -SMA с клиническими факторами неблагоприятного прогноза (нарушение функции почек, уровень протеинурии).
3. Интерстициальная экспрессия α -SMA может рассматриваться как морфологический признак прогрессирования первичного гломерулонефрита у детей и подростков.

Литература

1. Aldigier, JC, Kanjanabuch, T, Ma, L-J, Brown, NJ, Fogo, AB (2005) Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 16:3306 – 3314.
2. Azizi, M, Webb, R, Nussberger, J, Hollenberg, NK (2006) Renin inhibition with aliskiren: where are we now, and where are we going? *J Hypertens* 24:243 – 256.
3. Eddy, AA, Fogo, AB (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 17:2999 – 3012.
4. Efsthathios Alexopoulos, Lazaros Gionanlis, Ekaterini Papayianni, Elizabeth Kokolina, Maria Leontsini, and Dimitrios Memmos Predictors of outcome in idiopathic rapidly progressive glomerulonephritis (IRPGN) *BMC Nephrol*. 2006; 7: 16.
5. Epstein, M (2006) Aldosterone blockade: an emerging strategy for abrogating progressive renal disease. *Am J Med* 119:912 – 919.
6. Hay, ED, Zuk, A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 678 – 690.
7. Hotta, O, Furuta, T, Chiba, S, Tomioka, S, Taguma, Y (2002) Regression of IgA nephropathy: a repeat biopsy study. *Am J Kidney Dis* 39:493 – 502.
8. Jinde, K, Nikolic-Paterson, DJ, Huang, XR, Sakai, H, Kurokawa, K, Atkins, RC, Lan, HY Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct;38(4):761-9.
9. Kriz, W, Gretz, N, Lemley, KV (1998) Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54:687 – 697.
10. Kipari, T, Hughes, J (2002) Macrophage-mediated renal cell death. *Kidney Int* 61:760 – 761.
11. Katz, A, Caramori, ML, Sisson-Ross, S, Gropoli, T, Basgen, JM, Mauer, M (2002) An increase in the cell component of the cortical interstitium antedates interstitial fibrosis in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 61:2058 – 2066.
12. Kawasaki, Y, Suzuki, J, Sakai, N, Tanji, M, Suzuki, H Predicting the prognosis of renal dysfunction by renal expression of alpha-smooth muscle actin in children with MPGN type 1 *Am J Kidney Dis*. 2003 Dec;42(6):1131-8.
13. Kaneko, Y, Nakazawa, K, Higuchi, M, Hora, K, Shigematsu, H Glomerular expression of alpha-smooth muscle actin reflects disease activity of IgA nephropathy *Pathol Int*. 2001 Nov;51(11):833-44.

14. MacKinnon, M, Shurraw, S, Akbari, A, Knoll, GA, Jaffey, J, Clark, HD (2006) Combination therapy with an angiotensin receptor blocker and an ACE inhibitor in proteinuric renal disease: a systematic review of the efficacy and safety data. *Am J Kidney Dis* 48:8 – 12.
15. Nakao, N, Yoshimura, A, Morita, H, Takada, M, Kayano, T, Ideura, T (2003) Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non diabetic renal disease (COOPERATE): a randomised controlled trial. *Lancet* 361:117 – 124.
16. Neilson, EG (2006) Mechanisms of disease: fibroblasts — a new look at an old problem. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:101 – 108.
17. Oikawa, T, Freeman, M, Lo, W, Vaughan, DE, Fogo, A (1997) Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin – angiotensin inhibition. *Kidney Int* 51:164 – 172.
18. Remuzzi, G, Bertani, T (1990) Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* 38:384 – 394.
19. Shankland, SJ (2006) The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 69:2131 – 2147.
20. Strutz, F, Okada, H, Lo, CW et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSPI. *J Cell Biol* 1995; 130: 393 – 405.
21. Strutz, F. Novel aspects of renal fibrogenesis. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1526 – 1532.
22. Wolf, G, Neilson, EG (1993) Angiotensin II as a renal growth actor. *J Am Soc Nephrol* 3:1531 – 1540.
23. Wu, DT, Bitzer, M, Ju, W, Mundel, P, Bottinger, EP (2005) TGF-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 16:3211 – 3221