

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. The incidence of secondary leukemias / G. Leone [et al.] // Haematologica. — 1999. — Vol. 84. — P. 937–945.
2. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children treated for cancer: comparison with primary presentation / D. Barnard [et al.] // Blood. — 2002. — Vol. 100. — P. 427–434.
3. Risk of adverse events after completion of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia / C. H. Pui [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23. — P. 7936–7941.
4. Risk of subsequent malignant neoplasms among 1,641 Hodgkin's disease patients diagnosed in childhood and adolescence: a population-based cohort study in the five Nordic countries / R. Sankila [et al.] // J. Clin. Oncol. — 1996. — Vol. 14. — P. 1442–1445.
5. Low risk of secondary leukemias after chemotherapy without mechlorethamine in childhood Hodgkin's disease / G. Shellong [et al.] // J Clin Oncol. — 1997. — Vol. 15. — P. 22472–22453.
6. Risk of leukemia following treatment for non Hodgkin's lymphoma / L. B. Travis [et al.] // J. Natl Cancer Inst. — 1994. — Vol. 86. — P. 1450–1457.
7. Treatment-related myelodysplasia and acute leukemia in non-Hodgkin's lymphoma patients / J. O. Armitage [et al.] // J. Clin Oncol. — 2003. — Vol. 21. — P. 897–906.

Поступила 12.05.2009

УДК: 616.611-002-053.2-07-037

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ТКАНИ ПОЧЕК
ПРИ ПЕРВИЧНЫХ ГЛОМЕРУЛОПАТИЯХ**

В. В. Савош, Т. А. Летковская, Е. Д. Черствый

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Работа посвящена изучению морфологических изменений интерстиция и канальцев почки, а также экспрессии гладкомышечного актина- α , трансформирующего фактора роста- β и некоторых компонентов экстрацеллюлярного матрикса (коллагена IV типа, фибронектина) при первичных гломерулопатиях у детей. В результате комплексного анализа морфологических и клинических данных была выявлена статистически достоверная связь между уровнями экспрессии α -SMA и ТФР- β и количеством в почечном интерстиции коллагена IV типа и фибронектина. Также установлена взаимосвязь выраженности экспрессии α -SMA и ТФР- β от уровня суточной экскреции белка, что позволяет отнести протеинурию к неблагоприятным факторам в прогрессировании хронических болезней почек.

Ключевые слова: гломерулопатия, тубулоинтерстициальные изменения, фиброз, миофибробласты, экстрацеллюлярный матрикс.

**MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL DESCRIPTION
OF INTERSTITIAL TISSUE IN PRIMARY GLOMERULOPATHY**

V. V. Savosh, T. A. Liatkouskaya, E. D. Cherstvoy

Belorussian State Medical University, Minsk

The purpose of our study was to ascertain the possible relationships between number of interstitial myofibroblasts, TGF- β and interstitial deposition of matrix proteins in the renal tissue of patients with primary glomerulopathies with the use of immunostaining. There was a significant correlation between level of proteinuria and interstitial α -SMA expression, and tubular expression of TGF- β . Interstitial α -SMA expression was significantly higher in patients with nephrotic proteinuria level compared with patients with urinary protein excretion less than 1 g/l. A highly significant correlation was also evident between the number of interstitial myofibroblasts and interstitial deposition of collagen types IV and fibronectin ($p < 0,05$). We found that tubulointerstitial changes in the renal tissue of patients with proteinuric glomerulopathies were accompanied by increases number of interstitial myofibroblasts and expression of collagen type IV and fibronectin.

Key words: glomerulopathy, tubulointerstitial changes, fibrosis, myofibroblasts, extracellular matrix.

Прогрессирование хронических заболеваний почек с нарастанием почечной недостаточности, требующей заместительной почечной терапии на терминальной стадии, является одной из основных проблем в теоретической и практической нефрологии [1, 2]. В настоящее время многие экспериментальные и клинические исследования продемонстрировали особое значение изменений тубулоинтерстициального компонента в формировании и прогрессировании хронической почечной недоста-

точности не зависимо от выраженности изменений клубочков почки [3, 4].

Морфологические изменения тубулоинтерстициального компонента при гломерулопатиях представляют собой различной степени повреждения эпителия, базальной мембраны канальцев, интерстиция, кровеносных и лимфатических сосудов [3, 5].

Повреждение интерстициальной ткани — сложный многофакторный процесс, который является результатом взаимообусловленного влия-

ния неиммунных и иммунных факторов, таких как протеинурия, тубулярная ишемия и гипоксия, изменение реабсорбции тубулярной жидкости, а также цитокинов, факторов роста и т. д. [6]. Каждый из этапов тубулоинтерстициального повреждения является результатом сложных межклеточных взаимодействий, осуществляемых большим числом вазоактивных, про- и противовоспалительных цитокинов и факторов роста, синтез которых запрограммирован на генетическом уровне.

В конечном итоге развивается тубулоинтерстициальный фиброз (ТИФ), который является патоморфологической основой прогрессирования хронических болезней почек. Накопление избыточного количества матричных белков в интерстициальной ткани почек опосредуется увеличением синтеза матричных протеинов, сниженной деградацией этих протеинов вследствие уменьшения синтеза некоторых протеаз, либо их активности за счет гиперпродукции или гиперактивности протеазных ингибиторов [7]. Основными профиброгенными клетками в ткани почек являются миофибробласты, которые как синтезируют в большом количестве компоненты экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) (коллагены I, III и IV типов, ламинин, фибронектин и др.), так и ингибиторы протеаз, предотвращающих разрушение матричных белков [8, 9]. Их количество в ткани почек увеличивается в результате пролиферации и активации резидентных фибробластов, которые изменяют свой фенотип (начинают экспрессировать на своей поверхности гладкомышечный актин- α) и секретируют матричные белки.

Кроме этого, увеличение числа миофибробластов может происходить в результате изменения фенотипа клеток канальцевого эпителия в процессе эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) [10]. Началом ЭМТ является разрушение канальцевой базальной мембраны под воздействием протеинурии, гипоксии и др. повреждающих факторов, а также некоторых цитокинов, например, трансформирующего фактора роста- β (ТФР- β) и эпидермального фактора роста. Клетки теряют апикально-базальную полярность, начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры, такие как виментин и фибробластоспецифический белок, и снижают экспрессию эпителиальных маркеров: цитокератина, Е-кадгерина и др., затем меняют свою форму за счет изменения эндогенного цитоскелета, мигрируют в межканальцевое пространство, превращаясь в активированные миофибробласты [11]. Клетки, трансформированные в фибротические, приобретают значительную миграционную и пролиферативную активность. Они отличаются высокой пролиферативной активностью и синтезируют повышенное количество белков ЭЦМ [8, 9].

Важную роль в процессе фиброизирования придают нарушению метаболизма фибронектина. Этот адгезивный гликопротеин, как думают, формирует основу для накопления других белков: он также функционирует как хемотрактант для фибробластов [12]. Кроме того, фибронектин является лигандом для адгезивных молекул — интегринов, принимающих участие в процессах миграции и локального взаимодействия клеток друг с другом и окружающим матриксом. Связываясь с мезангиоцитами и фибробластами, фибронектин стимулирует пролиферацию этих клеток, что ведет к накоплению внеклеточного матрикса [13]. По современным представлениям, среди компонентов ЭЦМ именно депозиция фибронектина в почечной ткани более всего коррелирует с тяжестью структурных повреждений и выраженностью почечной недостаточности [14].

На всех стадиях развития тубулоинтерстициальных изменений большое количество цитокинов и ростовых факторов регулирует сложную систему межклеточных взаимодействий. Среди всех цитокинов, участвующих в формировании ТИИ, наиболее выраженным профиброгенным действием обладает ТФР- β , который вызывает большое разнообразие ответов, приводящих к почечному фиброзу, включая увеличение матричного синтеза, угнетение матричной деградации, увеличивает концентрацию хемотрактантов фибробластов и моноцитов и участвует практически во всех этапах формирования ТИФ [15]. ТФР- β синтезируется многими резидентными клетками тканей, а также инфильтрирующими лейкоцитами, мононуклеарными клетками и тромбоцитами.

Изучению различных цитокинов, компонентов экстрацеллюлярного матрикса при гломерулярных поражениях почек посвящено большое количество публикаций и разработок, однако многие вопросы, касающиеся значения этих биомолекулярных маркеров для индивидуального прогноза заболевания, а также в зависимости от нозологического вида гломерулопатий, остаются открытыми. В связи с этим важной проблемой нефрологии является выявления факторов, предопределяющих развитие тех или иных морфологических изменений, а также выделение комплекса информативных клинико-морфологических прогностических критериев различных вариантов течения первичных гломерулопатий.

Цель исследования

Изучить экспрессию трансформирующего фактора роста- β в интерстиции почек и его влияние на количество и синтетическую активность интерстициальных миофибробластов при разных морфологических типах гломерулопатий у детей, а также определение прогностической значимости этих маркеров.

Материал и метод

Исследование выполнено на архивном и текущем материале нефробиопсий, выполненных в нефрологическом отделении 2-й детской клинической больницы г. Минска за период с января 2001 по декабрь 2008 гг. включительно. Из исследования исключались все варианты вторичных гломерулопатий (диабетическая нефропатия, волчаночный нефрит, поражения почек при других заболеваниях соединительной ткани и васкулитов), 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 для проведения в дальнейшем морфометрического анализа количеством в биоптате ткани почечной паренхимы.

В результате для дальнейшего исследования было отобрано 132 нефробиопсии. Из них у 108 пациентов нефробиопсии выполнялись однократно для верификации диагноза, а у 12 детей через различные временные промежутки (от 6 месяцев до 5 лет) были выполнены повторные биопсии для контроля динамики процесса или уточнения морфологического диагноза.

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 др.).

Для морфологической характеристики материала нефробиопсий препараты окрашивали гематоксилином и эозином, по Масону, по MSB и реактивом Шиффа (ШИК-реакция), а также во всех случаях проводилось иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с использованием антител к иммуноглобулинам класса А (IgA, DAKO Cytomation), гладкомышечному актину-а (a-SMA, DAKO Cytomation), трансформирующему фактору роста- β (ТФР- β , MILLIPORE S.A.S.), а также к отдельным компонентам экстрацеллюлярного матрикса — коллаген IV типа, фибронектин (DAKO Cytomation).

При исследовании срезов, окрашенных по Масону и MSB, оценивали степень выраженности интерстициального фиброза, которая представлялась полуколичественно в баллах: 0 — отсутствие изменений в почечной 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.

Морфометрический анализ экспрессии иммуногистохимических маркеров выполнялся при помощи программы-анализатора изображений Aperio Image Score, автоматически измеряющая в интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции хромогена диаминобензидина), с последующим расчетом коэффициента экспрессии, равного соотношению числа позитивных пикселей к их общему числу (КЭ).

Также была проведена оценка по 4-балльной шкале интенсивности перигломерулярной инфильтрации миофибробластами (a-SMA-позитивными клетками): 0 — отсутствие миофибробластов в перигломерулярном пространстве; 1 балл — наличие единичных, поддающихся количественному подсчету, SMA-позитивных клеток; 2 балла — наличие множественных, поддающихся количественному подсчету, SMA-позитивных клеток, расположенных вокруг клубочка в один слой либо группами, 3 балла — наличие множества SMA-позитивных клеток, расположенных перигломерулярно в нескольких слоях.

Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы «Statistica 6.0» (StatSoft, 2001).

Результаты исследования

Возраст пациентов на момент проведения биопсии колебался от 6 месяцев до 17 лет и составил в среднем $11,1 \pm 4,51$ лет, соотношение мальчиков и девочек было практически одинаково (48,4 и 51,6 % соответственно). 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 — Морфологические варианты первичных гломерулопатий

Морфологический вариант поражений клубочков	Число случаев
Минимальные изменения на фоне нефротического синдрома	31
Мезангио-пролиферативный гломерулонефрит	25
Болезнь Берже (IgA нефропатия)	25
Фокально-сегментарный гломерулосклероз	25
Мембрано-пролиферативный гломерулонефрит	14

При проведении ИГХ экспрессия α -SMA наблюдалась во всех препаратах в виде четкого цитоплазматического окрашивания миофибробластов, гладкомышечных клеток почечных сосудов. Кроме того, в части случаев отмечалось четкое цитоплазматическое окрашивание отдельных эпителиальных клеток проксимальных и дистальных канальцев. Также во всех случаях обнаруживалась экспрессия ТФР- β различной интенсивности в клубочках и интерстициальной ткани почки в виде цитоплазматического окрашивания миофибробластов, эндотелиальных клеток, мезангиоцитов. При наличии у пациентов стойкой протеинурии отмечалось также цитоплазматическое гранулярное окрашивание базальных отделов эпителиоцитов отдельных проксимальных канальцев почки.

Экспрессия коллагена IV типа выявлялась во всех нефробиоптатах в виде четкого окрашивания базальных мембран канальцев и капилляров клубочков, а также капсулы Шум-

лянского-Боуэна. Кроме того, отмечалась выраженная экспрессия коллагена IV типа в участках с наличием воспалительной инфильтрации и при расширении межканальцевой стромы, а также в участках сегментарного и (или) глобального гломерулосклероза. Экспрессия фибронектина выявлялась в виде четкого окрашивания мезангиума клубочков почки, преимущественно в участках расширения мезангиального матрикса и гломерулосклероза, а также различной степени интенсивности в участках перитубулярного и перигломерулярного матрикса. В участках интерстициального фиброза и лимфогистиоцитарной инфильтрации отмечалась более выраженная экспрессия количества фибронектина.

Была проведена оценка экспрессии иммуногистохимических маркеров с помощью программы Aperio Image Scope, значения полученных коэффициентов экспрессии (КЭ) для каждого из исследованных маркеров приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Коэффициенты экспрессии иммуногистохимических маркеров в интерстициальной ткани почки при первичных гломерулопатиях

Исследуемый маркер	Минимальное значение	Максимальное значение	Медиана	25-й перцентиль	75-й перцентиль
ТФР- β	0,0892	0,6084	0,3603	0,2117	0,3974
α -SMA	0,0007	0,3633	0,0818	0,0527	0,1199
Коллаген IV типа	0,0701	0,4965	0,2168	0,1722	0,2991
Фибронектин	0,0195	0,535	0,1345	0,1002	0,186

В результате обработки полученных данных была выявлена статистически достоверная прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии α -SMA и количеством в почечном интерстиции как ТФР- β , так и коллагена IV типа ($\rho = 0,54$, $p = 0,009$ и $\rho = 0,63$, $p = 0,025$ соответственно). Кроме того, отмечалось достоверное увеличение количества фибронектина в интерстициальной ткани почки при повышении коэффициента интерстициальной экспрессии α -SMA и ТФР- β ($\rho = 0,43$, $p = 0,049$ и $\rho = 0,37$, $p = 0,044$ соответственно).

При сравнении средних значений экспрессии исследованных маркеров с помощью непараметрического Н-критерия Крускала-Уоллиса было выявлено увеличение интерстициальной экспрессии α -SMA и фибронектина в группах с умеренным и выраженным интерстициальным фиброзом, в то время как для ТФР- β и коллагена IV типа подобной закономерности выявлено не было. Также была установлена статистически значимая взаимосвязь между выраженностью как перигломерулярной, так и ин-

терстициальной инфильтрации миофибробластами ткани почки в материалах первичных нефробиопсий и степенью развития интерстициального фиброза в повторной биопсии ($\rho = 0,68$ и $\rho = 0,56$ соответственно при $p < 0,01$).

Статистически достоверных различий в экспрессии α -SMA в группах с различными морфологическими изменениями клубочков не отмечалось, однако были выявлены различия интерстициальной экспрессии α -SMA в зависимости от суточной протеинурии. При использовании непараметрического критерия Манна-Уитни в группе больных с суточной экскрецией белка более 1 г по сравнению с группой больных с незначительной протеинурией (менее 1 г/сут.) отмечался статистически более высокий уровень экспрессии α -SMA и ТФР- β ($Z = 2,083$, $p = 0,037$ и $Z = 5,124$, $p = 0,025$ соответственно), что позволяет рассматривать протеинурию в качестве неблагоприятного прогностического фактора в развитии интерстициального фиброза и прогрессировании хронических болезней почек (таблица 3).

Таблица 3 — Значение коэффициента экспрессии α -SMA и TФР- β в почечном интерстиции при различных уровнях протеинурии

Уровень суточной протеинурии	Маркер	Минимальное значение	Максимальное значение	Медиана	25-й перцентиль	75-й перцентиль
Протеинурия < 1 г/сут	α -SMA	0,0169	0,2637	0,0882	0,0542	0,1183
	TФР- β	0,0892	0,4562	0,2503	0,1756	0,3974
Протеинурия > 1 г/сут	α -SMA	0,0007	0,3633	0,073	0,0306	0,1092
	TФР- β	0,1089	0,6084	0,2803	0,1985	0,3784

Заключение

Таким образом, миофибробласты играют важную роль в развитии ТИФ, участвуя в синтезе большого количества белков ЭЦМ (например, коллагена IV типа, фибронектина). Наличие взаимосвязи между выраженностью интерстициальной и перигломерулярной экспрессии α -SMA в дебюте заболевания и степенью ТИФ при повторном морфологическом исследовании позволяет рассматривать инфильтрацию миофибробластами в качестве возможного предиктора быстрого прогрессирования хронических болезней почек. Кроме того, одним из неблагоприятных прогностических факторов является увеличение уровня суточной экскреции белка более 1 г, сопровождающееся увеличением экспрессии как α -SMA, так и TФР- β в ткани почек.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Allison, A. Eddy Molecular Insights Into Renal Interstitial Fibrosis / A. Allison // J. Am. Soc. Nephrol. — 1996. — Vol. 7. — P. 2495–2508.
- Agnes, B. Fogo Mechanisms of progression of chronic kidney disease / B. Agnes // Pediatr Nephrol. — 2007. — Vol. 22. — P. 2011–2022.
- Risdon, R. A. Relationship between renal function and histologic changes found in renal biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis / R. A. Risdon, J. C. Sloper, H. E. de Vardener // Lancet. — 1968. — Vol. 2. — P. 363–366.
- Nath, K. A. The tubulointerstitium in progressive renal disease / K. A. Nath // Kidney International. — 1998. — Vol. 54. — P. 992–994.
- Masaomi, N. Mechanisms of Tubulointerstitial Injury in the Kidney: Final Common Pathways to End-stage Renal Failure / N. Masaomi // Internal Medicine. — 2004. — Vol. 43. — P. 9–17.
- D'Amico, G. Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of renal damage / G. D'Amico, F. Ferrario, M. P. Rastaldi // Am J Kidney Dis. — 1995. — Vol. 26. — P. 124–132.
- Renal Fibrosis: Extracellular Matrix Microenvironment Regulates Migratory Behavior of Activated Tubular Epithelial Cells // M. Zeisberg [et al.] // Am J Pathol. — 2002. — Vol. 160. — P. 2001–2008.
- Muchaneta-Kubara, E. C. El Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring / E. C. Muchaneta-Kubara, A. M. Nahas // Nephrol Dial Transplant. — 1997. — Vol. 12. — P. 904–915.
- Furness, P. N. Extracellular matrix and the kidney / P. N. Furness // J Clin Pathol. — 1996. — Vol. 49. — P. 355–359.
- Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in canine glomerulonephritis / L. Aresu [et al.] // Virchows Arch. — 2007. — Vol. 451. — P. 937–942.
- Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis // A. Desmoulière [et al.] // Laboratory Investigation. — 2003. — Vol. 83, № 1. — P. 1689–1707.
- Фибронектин мочи как показатель процессов фиброобразования в почках при нефрите / Л. В. Козловская [и др.] // Терапевтический архив. — 1999. — № 6. — С. 34–38.
- Transforming growth factor- β 1 differentially mediates fibronectin and inflammatory cytokine expression in kidney tubular cells // W. Qi [et al.] // Am J Physiol Renal Physiol. — 2006. — Vol. 291. — P. 1070–1077.
- Relevance of Periglomerular Myofibroblasts in Progression of Human Glomerulonephritis / S. Oba [et al.] // Am J Kidney Dis. — 1998. — Vol 32, № 3. — P. 419–425.
- Effects of Transforming Growth Factor- β 1 on Renal Extracellular Matrix Components and Their Regulating Proteins // J. A. Douthwaite [et al.] // J Am Soc Nephrol. — 1999. — Vol. 10. — P. 2109–2119.

Поступила 05.05.2009

УДК 618.11-006.6-085:578.264.3

ЭКСПРЕССИЯ МУТАНТНОГО P53 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ФОРМ РАКА ЯИЧНИКОВ

А. В. Мойсей

Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

Поиск путей преодоления химиорезистентности опухоли посредством определения молекулярно-биологических маркеров-мишеней с целью применения наиболее эффективных лекарственных препаратов является актуальной проблемой современной онкогинекологии. Целью исследования явилось изучение уровня экспрессии p53 при распространенном раке яичников. Иммуногистохимическим методом определена экспрессия p53 у 80 больных раком яичников III–IV стадии, которым в период с 1999 по 2002 гг. было проведено хирургическое лечение в ГУ «Научно-исследовательский институт онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова». Экспрессия p53 выявлена в 61,3 % наблюдений, при этом в 67,3 % случаев химиорезистентной и в 38,8 % химиочувствительной групп. В исследуемых группах больных выявлены статистически значимые различия по интенсивности окрашивания, количеству окрашенных клеток p53 в баллах, по сумме баллов (Score), а также по абсолютному значению окрашенных клеток ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни). Уровень экспрессии p53 выше при серозном, эндометриоидном и недифференцированном вариантах рака яичников химиорезистентной группы.

Ключевые слова: рак яичников, химиорезистентность, мутантный p53 онкопротеин.