

**Мезангиальная и интерстициальная макрофагальная инфильтрация в ткани**

**почек у детей и подростков с первичными гломерулопатиями**

Белорусский государственный медицинский университет

Исследована выраженность макрофагальной инфильтрации в препаратах нефробиопсий 86 детей и подростков с различными вариантами первичных гломерулопатий. Гломерулярная макрофагальная инфильтрация отрицательно коррелировала с длительностью заболевания до проведения нефробиопсии. Положительная корреляционная взаимосвязь отмечалась с выраженностью мезангиального повреждения и повышенным уровнем креатинина в дебюте заболевания. Мы не выявили взаимосвязи с уровнем протеинурии, наличием гломерулосклероза или интерстициального фиброза. Интерстициальная макрофагальная инфильтрация коррелировала с уровнем протеинурии, уровнем креатинина и снижением скорости клубочковой фильтрации. Мы выявили позитивную корреляционную взаимосвязь с наличием гломерулосклероза, интерстициального фиброза и маркером миофибробластов -  $\alpha$ -SMA. Интерстициальная макрофагальная инфильтрация была достоверно выше у пациентов с прогрессирующим течением заболевания. Определение выраженности интерстициальной макрофагальной инфильтрации может быть информативным критерием клинического прогрессирования первичных гломерулопатий.

Ключевые слова: Дети, первичные гломерулопатии, макрофаги, нефробиопсия, прогрессирование.

Введение. Первичные гломерулопатии - сборная группа заболеваний почек, характеризующихся поражением гломерул, не связанным с системными заболеваниями, опухолями, инфекциями и генетическими дефектами. У детей наиболее распространенными первичными гломерулопатиями являются иммуноглобулин А (IgA)-нефропатия и нефротический синдром с минимальными изменениями (НСМН), мезангиопролиферативный гломерулонефрит (МзПГН). В подростковом возрасте возрастает частота фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС), а также мембранознопролиферативного гломерулонефрита (МБПГН).

В генезе и прогрессировании гломерулопатий важную роль играют моноциты/макрофаги [1, 2]. Провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-1 (IL-1), участвуют в повреждении клубочков. Макрофаги также продуцируют ряд цитокинов и ростовых факторов (тромбоцитарный фактор роста (PDGF), эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ )), которые непосредственно вызывают гломерулярное повреждение, а также стимулируют клеточную пролиферацию, активацию мезангиоцитов и продукцию ими мезангиального матрикса [3,4,5,6,7,8,]. Число гломерулярных макрофагов в первую очередь возрастает при морфологических вариантах гломерулопатий с выраженными воспалительными изменениями в клубочках (МБПГН, МзПГН, IgA-нефропатия).

Независимо от морфологического варианта гломерулопатии необратимое снижение функции почек наступает при присоединении тубуло-интерстициальных изменений, в первую очередь интерстициального фиброза и атрофии канальцев [9]. В формировании интерстициального фиброза значительная роль принадлежит макрофагам. Свободные радикалы, эйкозаноиды, а также провоспалительные цитокины (IL-1, TNF- $\alpha$ ), источником которых являются клетки воспалительного инфильтрата, участвуют в повреждении канальцевого эпителия. Факторы роста, в первую очередь TGF- $\beta$  и PDGF, которые продуцируются макрофагами, стимулируют активацию фибробластов и продукцию ими внеклеточного матрикса [10, 11]. Таким образом, макрофаги участвуют в прогрессировании

повреждения ткани почек при гломерулопатиях, и количественная характеристика макрофагальной инфильтрации может служить предиктором течения гломерулопатий.

Целью данного исследования была оценка взаимосвязей выраженности мезангиальной и интерстициальной макрофагальной инфильтрации с клиническими параметрами и морфологическими изменениями у детей и подростков с различными вариантами первичных гломерулопатий.

Пациенты и методы. В исследование включены 86 детей и подростков с первичными гломерулопатиями, проходивших обследование и лечение в Республиканском центре детской нефрологии и почечно-заместительной терапии в 2005-2008 годах. Мальчиков было 42, девочек 44. Средний возраст пациентов составил  $11,97 \pm 0,49$  лет, медиана 13 лет, средний возраст дебюта заболевания составил  $7,68 \pm 0,6$  лет, медиана 6,5 лет. Средняя длительность наблюдения от начала заболевания до момента проведения нефробиопсии была  $3,69 \pm 0,43$  года, медиана 2,92 года.

При анализе учитывались возраст и пол пациента, возраст проведения нефробиопсии и возраст дебюта заболевания, длительность заболевания до проведения нефробиопсии, клинические проявления в дебюте заболевания, клиническая форма, уровень мочевины и креатинина, скорость клубочковой фильтрации (СКФ), повышение артериального давления, уровень протеинурии, выраженность гематурии, наличие эпизодов макрогематурии, острофазовые показатели на момент проведения нефробиопсии. Клиническая и морфологическая характеристики пациентов исследованной группы представлены на рисунке 1.

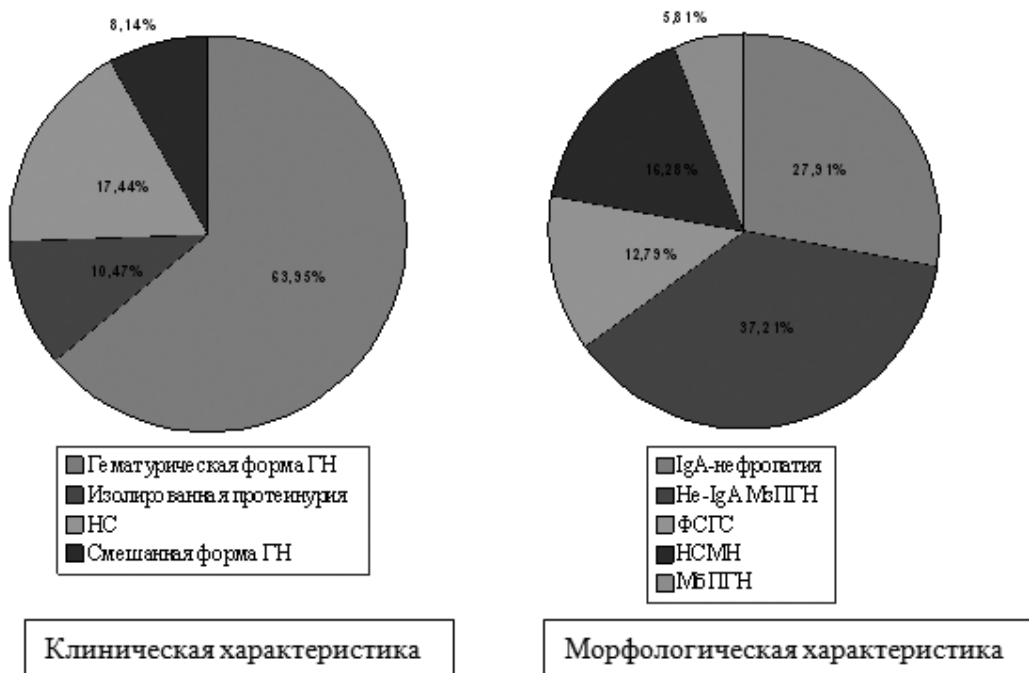


Рисунок 1 – Клиническая и морфологическая характеристика исследованной группы больных детей

У 25 пациентов с длительностью наблюдения не менее 1 года после проведения нефробиопсии (средняя длительность  $1,31 \pm 0,24$  года, медиана 1 год) мы оценили прогностический потенциал количественного определения макрофагальной инфильтрации. Мальчиков было 13, девочек 12. Средний возраст составил  $11,06 \pm 1,02$  лет, медиана 12 лет. В зависимости от клинических данных при наиболее позднем осмотре (уровень протеинурии, АД, СКФ, уровень мочевины, креатинина) пациенты были разделены на 2

группы: с прогрессирующим (n=8) и стабильным (n=17) течением. У пациентов этих двух групп был проведен сравнительный анализ выраженности макрофагальной инфильтрации гломерул и интерстиция.

Препараты нефробиопсий были получены при пункционной чрезкожной биопсии под контролем УЗИ. Ткань почек фиксировалась в 10% нейтральном формалине, обрабатывалась по стандартной методике и заключалась в парафин. Толщина гистологических срезов составила 4 мкм. Во всех случаях диагноз гломерулопатии был верифицирован морфологически по гистологическим препаратам, окрашенным гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа, трихромом по Масону на основе критериев, изложенных в Монографии ВОЗ: классификация и атлас гломерулярных заболеваний. При морфологическом исследовании все показатели, кроме выраженности макрофагальной инфильтрации, оценивались полуколичественно. Учитывались следующие признаки: выраженность, распространенность и характер мезангиальной пролиферации, эндокапиллярная пролиферация, экстракапиллярная пролиферация, инфильтрация интерстиция, клеточный состав инфильтрата, дистрофия тубулярного эпителия. Степень выраженности склеротических изменений оценивалась полуколичественно в препаратах, окрашенных по трихромом или MSB: сегментарный гломерулосклероз, глобальный гломерулосклероз, интерстициальный склероз. Было проведено иммуногистохимическое окрашивание с коммерческими поликлональными антителами к иммуноглобулину А (IgA), иммуноглобулину G (IgG), иммуноглобулину М (IgM), С3с компоненту комплемента (DAKO Cytomation, Denmark). Для выявления макрофагов в ткани почек проводилось иммуногистохимическое окрашивание с коммерческими моноклональными антителами к CD68 (DAKO Cytomation, Denmark) в разведении 1:100. Использовалась стандартная авидин-биотин пероксидазная методика с позитивным и негативным (исключение первичного антитела) контролем с использованием системы визуализации EnVision. В качестве хромогена применяли диаминобензидин (Sigma). В каждом случае число CD68 позитивных клеток оценивалось во всех клубочках, после чего рассчитывалось среднее число макрофагов (CD68+клеток)/клубочек. Число интерстициальных макрофагов оценивалось в 10 полях зрения при увеличении x100, затем рассчитывалось среднее число макрофагов на мм<sup>2</sup>.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета SPSS 11.0.1 (SPSS, Inc.) Взаимосвязь между показателями определялась при помощи непараметрического двустороннего коэффициента корреляции Спирмена ( $\rho$ ). Для сравнения двух выборок использовался непараметрический двусторонний метод U-критерия Манна-Уитни. За уровень статистической значимости принимался  $p < 0,05$ . средние показатели представлены в виде средней  $\pm$  стандартная ошибка средней.

Результаты:

Гломерулярная макрофагальная инфильтрация и ее взаимосвязь с клиническими и морфологическими параметрами.

Нами обнаружены достоверные различия выраженности гломерулярной макрофагальной инфильтрации между пациентами с различными морфологическими вариантами гломерулонефрита (таблица 1). Наиболее высокие показатели инфильтрации CD68-позитивными клетками отмечались у пациентов с не IgA-МзПГН, ФСГС и МбПГН. Наименьшее число макрофагов на клубочек наблюдалось у пациентов с НСМН (рисунок 2).

Таблица 1 - Гломерулярная макрофагальная инфильтрация у пациентов различных морфологических групп

Форма	n	M±m	Медиана	p
IgA-нефропатия	24	0,73±0,21	0,42	1-4, p=0,031, 1-5, p=0,013
Не-IgA МзПГН	31	1,07±0,36	0,56	2-4, p=0,007, 2-5, p=0,032
ФСГС	11	1,79±0,84	0,5	3-4, p=0,02
НСМН	14	0,19±0,08	0,04	4-1, p=0,031, 4-2, p=0,007, 4-3, p=0,02, 4-5, p=0,002
МБПГН	5	4,24±1,75	4,17	5-1, p=0,013, 5-2, p=0,032, 5-4, p=0,002
Всего	85	0,96±0,22	0,4	

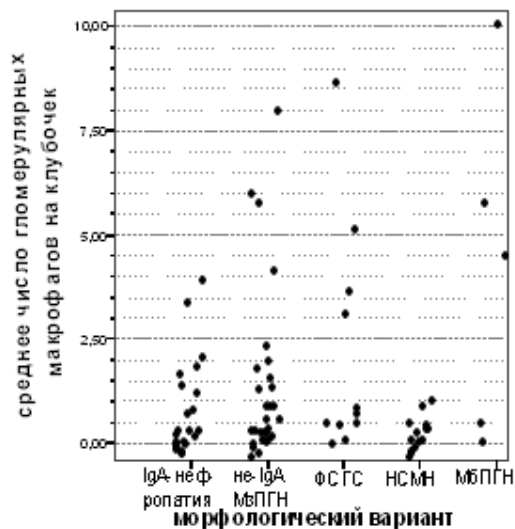
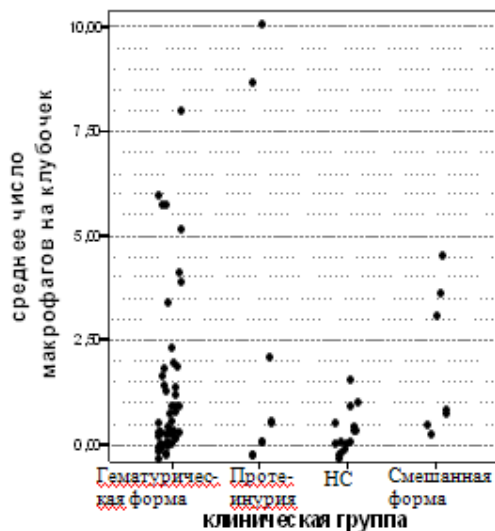


Рисунок 2 – Гломерулярная макрофагальная инфильтрация у пациентов различных клиничко-морфологических групп

При анализе выраженности макрофагальной инфильтрации клубочков у пациентов различных клинических групп наиболее высокие показатели были получены для пациентов с нефротическим синдромом с гематурией и/или гипертензией, а также с гематурией (рисунок 2). В группе пациентов с изолированной протеинурией (n=9) разброс значений был велик при небольшом числе наблюдений, что не позволило получить статистически достоверные результаты. Были выявлены существенные различия выраженности гломерулярной макрофагальной инфильтрации между пациентами различных клинических групп (таблица 2).