

О. В. Хмара¹, О. О. Дядик²

Імуногістохімічні особливості деяких складових сполучної тканини нирок при мезангіокапілярному гломерулонефриті І типу та дифузному вовчаковому гломерулонефриті

¹ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН України», м. Донецьк,²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ**Ключові слова:** мезангіокапілярний гломерулонефрит І типу, вовчаковий нефрит, імуногістохімія.

З метою вивчення деяких складових та особливостей сполучної тканини в біоптатах нирок здійснили дослідження у хворих на мезангіокапілярний гломерулонефрит І типу та дифузний вовчаковий гломерулонефрит на підставі прижиттєвого морфологічного дослідження з використанням імуногістохімічних методів із залученням морфометричної обробки матеріалу та статистичних методів дослідження. Виявили особливості вмісту віментина та гладком'язового актину у гломерулярному і тубуло-інтерстиційному апараті нирок при цих двох патологіях для поліпшення диференційної діагностики та прогнозу захворювання.

Иммуногистохимические особенности некоторых компонентов соединительной ткани почек при мезангиокапиллярном гломерулонефрите I типа и диффузном волчаночном гломерулонефрите

Е. В. Хмара, Е. А. Дядык

С целью изучения состава и особенностей соединительной ткани в биоптатах почек провели исследования больных с мезангиокапиллярным гломерулонефритом I типа и диффузным волчаночным гломерулонефритом на основании прижизненного морфологического исследования с использованием иммуногистохимического, морфометрического исследования материала с применением статистических методов. Установлены особенности наличия виментина и гладкомышечного актина в гломерулярном и тубуло-интерстициальном аппарате почек при этих патологиях для оптимизации дифференциального диагноза и прогноза заболевания.

Ключевые слова: мезангиокапиллярный гломерулонефрит I типа, волчаночный нефрит, иммуногистохимия.**Патология.** – 2014. – №3 (32). – С. 60–63

Immunohistochemical features of some connective tissue components of kidney in mesangiocapillary glomerulonephritis type I and diffuse lupus glomerulonephritis

O. V. Khmara, O. O. Dyadyk

Aim. To study immunohistochemical features of some connective tissue components of kidney in mesangiocapillary glomerulonephritis type I and diffuse lupus glomerulonephritis.

Methods and results. The features of some components of connective tissue in kidney biopsies of patients with mesangiocapillary glomerulonephritis type I and diffuse lupus glomerulonephritis were studied using immunohistochemical, morphometrical and statistical methods of data analysis.

Conclusion. The peculiarities of vimentin and smooth muscle actin distribution in the glomerular and tubular-interstitial apparatus of kidney during these two conditions were identified that can be used for facilitation of differential diagnostic optimization and prognosis of the disease.

Key words: Mesangiocapillary Glomerulonephritis, Lupus Nephritis, Immunohistochemistry.**Pathologia.** 2014; №3 (32): 60–63

Гломерулонефрит (ГН) – мультифакторне імуноопосередковане запалення нирок з ініціальним ураженням клубочкового апарату з втягненням надалі в патологічний процес усіх структур нефрона з тенденцією до прогресування та переходом у нефросклероз і ниркову недостатність.

Прижиттєве морфологічне дослідження нирок (ПМДН) розглядається сьогодні як необхідна складова та «золотий стандарт» діагностики різних форм гломерулонефритів, визначення прогнозу захворювання, а також вибору всебічно обґрунтованих методів їх лікування [5, 6]. Інтерпретація даних вивчення ниркових біоптатів часто супроводжується чималими труднощами й потребує поряд із рутинними методами світлової мікроскопії застосування сучасних методів діагностики: імуногістохімічного дослідження (ІГХД) біоптатів [1,4,5,8,9].

До найбільш тяжких і найчастіших форм ГН належать первинний мезангіокапілярний ГН та ГН при системному червоному вовчаку (СЧВ) – вовчаковий гломерулонефрит (ВГН) [2,3,6,7].

Мезангіокапілярний гломерулонефрит (МКГН) І типу та дифузний вовчаковий гломерулонефрит (ДВГН) (за класифікацією 2003 р. – IV клас) мають схожі клінічні та морфологічні прояви й на початку захворювання диференційна діагностика є доволі складним завданням і неможлива без застосування ПМДН.

Одним із найважливіших факторів несприятливого прогнозу перебігу ГН є прогресування фіброзу гломерулярного та тубуло-інтерстиційного компонентів ниркової тканини.

Мета роботи

Визначення особливостей розподілу в нирках віментин-позитивних і α -SMA-позитивних складових сполуч-

ної тканини при мезангіокапілярному гломерулонефриті І типу та дифузному вовчаковому гломерулонефриті для удосконалення їхньої прижиттєвої диференційної діагностики.

Матеріали і методи дослідження

ІГХД проведено у 18 пацієнтів із МКГН І типу та 14 з ДВГН на підставі ПМДН. Дослідження виконали на парафінових зрізах. Як маркери використовували моноклональні антитіла до віментина та α -SMA. Надалі здійснили морфометричне опрацювання даних за допомогою програми AnalySIS Pro 3.2 (фірма виробник «Soft Imaging», ФРГ) на мікроскопі Olympus AX (Японія) з цифровою відеокамерою Olympus DP50. У кожному випадку ІГХД із описаними маркерами досліджували у 30 полях зору при збільшенні 200. Для підрахунку середньої кількості позитивних клітин у клубочках, інтерстиції на віментин та актин визначали площу кожного поля зору, виконували кількісний підрахунок позитивно забарвлених клітин (коричневе забарвлення), обчислювали середню кількість клітин на одиницю площі. Для підрахунку питомої ваги віментин- та актин-позитивних клітин в інтерстиції виділяли зони дослідження («зона інтересу»), далі надавали поріг кольорової чутливості для виділення позитивно забарвлених клітин, після чого за допомогою інструмента «Виділення за кольором» визначали площу «зони інтересу» та позитивно забарвлених ділянок (коричневе забарвлення), обчислюючи питому вагу (відсоток) позитивно забарвлених клітин.

Для кількісного аналізу даних, що отримали під час дослідження, використали методи біостатистики. Розрахунки здійснювали з використанням пакетів статистичного аналізу MedStat (Ю.Є.Лях, В.Г.Гур'янов, 2004) і «MedCalc» (MedCalc Software bvba, 2012).

Для аналізу кількісних ознак розраховували значення середнього арифметичного (\bar{X}) і стандартної похибки (m), для якісних ознак наведена частота прояву ознаки (%) та її стандартна похибка (m%) [7].

При порівнянні кількісних показників використали параметричні (у випадку нормального закону розподілу) або непараметричні (у випадку відмінності закону розподілу від нормального) критерії [7], для якісних

показників – критерій χ^2 [7]. Кореляційний зв'язок між ознаками виявили за методом кореляційного аналізу [7], також розраховували показник рангової кореляції Спірмена, ρ .

Результати та їх обговорення

У всіх спостереженнях як при МКГН І типу, так і при ДВГН мав місце інтерстиційний фіброз і гломерулосклероз різного ступеня виразності та поширеності. Враховуючи прогностичне значення для перебігу та особливостей патогенетичної терапії як гломерулосклерозу, так і інтерстиційного фіброзу, дослідили деякі компоненти сполучної тканини. У цій роботі наведені дані щодо імуногістохімічних особливостей маркерів гладком'язових структур і сполучної тканини, котрі свідчать про появу мікрофіламентів, що експресуються міофібробластами та знаходяться у ділянках ушкодження епітелію та залучаються до розвитку фіброзу в різних ниркових структурах. Взаємодія факторів, що впливають на активацію фіброзу, щільно пов'язані з феноменом епітеліально-мезенхімальної трансдиференціювання, коли епітеліальні клітини стають колаген-продукуючими та сприяють надалі розвитку фіброзу [7,8,9].

Крім напівкількісного оцінювання даних ІГХД для об'єктивізації результату, здійснили морфометричне дослідження (табл. 1).

При вивченні експресії віментина у гломерулярному апараті кількість позитивно забарвлених клітин при МКГН І типу (рис. 1, кольор. вкладка 2) становила $975,8 \pm 116,8$ на mm^2 , а при ДВГН – $817,5 \pm 94$ на mm^2 , ($p > 0,05$). Питома вага – $16,6 \pm 3,7\%$ та $10,2 \pm 3,2\%$ відповідно, різниця при цьому статистично значуща ($p < 0,05$). При оцінюванні експресії α -SMA у клубочковому апараті відзначили незначну відмінність між МКГН І типу та ДВГН. Так, при ДВГН кількість позитивно забарвлених клітин була трохи вища ($769,1 \pm 124,8$ на mm^2), ніж при МКГН І типу – $706,5 \pm 112,4$ на mm^2 , $11,6 \pm 4,4\%$ та $7,9 \pm 1,4\%$ відповідно (рис. 2, кольор. вкладка 2). Але результати статистичного дослідження показали, що ця різниця не була статистично значущою ($p > 0,05$).

Інтерстиційний фіброз встановили в усіх випадках,

Таблиця 1

Морфометрична характеристика деяких складових сполучної тканини при дифузному вовчаковому гломерулонефриті та мезангіокапілярному гломерулонефриті І типу

Показник	Хворі на ДВГН (n=14), $\bar{X} \pm m$	Хворі на МКГН І типу (n=18), $\bar{X} \pm m$	Рівень значущості відмінностей
Кількість віментин- позитивних клітин на 1 mm^2 у клубочках	817,5±94	975,8±116,8	0,150
Кількість віментин- позитивних клітин на 1 mm^2 у стромі	510,6±69	830±107,6	0,045*
Кількість актин- позитивних клітин на 1 mm^2 в клубочках	769,1±124,8	706,5±112,4	0,101
Кількість актин- позитивних клітин на 1 mm^2 у стромі	507,4±67,6	519,5±37,4	>0,9
Питома вага віментин- позитивних клітин у клубочках, %	10,2±3,2	16,6±3,7	0,045*
Питома вага віментин- позитивних клітин у стромі, %	6,4±2,5	7,8±1,3	0,072
Питома вага актин- позитивних клітин у клубочках, %	11,6±4,4	7,9±1,4	0,687
Питома вага актин- позитивних клітин у стромі, %	12,7±4,9	8,2±1,6	0,330

Примітки: * – різниця між групами статистично значуща, $p < 0,05$.

але ступінь його виразності, поширеності та особливості локалізації значно відрізнялись у кожному випадку. Так, при оцінюванні експресії віментина була вища кількість позитивно забарвлених клітин при МКГН I типу – $830 \pm 107,6$ на мм^2 , ніж при ДВГН – $510,6 \pm 69$ на мм^2 , ця різниця була статистично значущою ($p < 0,05$) (рис. 3, кольор. вкладка 2), питома вага – $7,8 \pm 1,3\%$ та $6,4 \pm 2,5\%$ відповідно. При оцінюванні експресії α -SMA отримали незначну різницю в бік МКГН I типу $519,5 \pm 37,4$ на мм^2 , а при ДВГН – $507,4 \pm 67,6$ на мм^2 ($8,2 \pm 1,6\%$ та $12,7 \pm 4,9\%$ відповідно) (рис. 4, кольор. вкладка 2). Ця різниця статистично не значуща ($p > 0,05$).

Під час порівняльного аналізу даних деяких складових сполучної тканини виявили, що середня кількість віментин-позитивних клітин у стромі та питома вага віментин-позитивних клітин у клубочках значущо вища ($p < 0,05$) при МКГН I типу, ніж при ДВГН (830 ± 107 та $510,6 \pm 69$ клітин на мм^2 , $16,6 \pm 3,7\%$ та $10,2 \pm 3,2\%$ відповідно). Різниця між середньою кількістю віментин-позитивних клітин у клубочках при МКГН I типу та при ДВГН ($975,8 \pm 116,8$ та $817,5 \pm 94$), актин-позитивних клітин у клубочках і стромі ($706,5 \pm 112,4$, $769,1 \pm 124,8$ та $519,5 \pm 37,4$, $507,4 \pm 67,6$ клітин на мм^2 відповідно), питома вагою віментин-позитивних ($7,8 \pm 1,3$ та $6,4 \pm 2,5\%$), актин-позитивних клітин у стромі ($8,2 \pm 1,6$ та $12,7 \pm 4,9\%$) та актин-позитивних клітин у клубочках ($7,9 \pm 1,4$ та $11,6 \pm 4,4\%$) не була статистично значущою ($p > 0,05$).

Висновки

1. Протягом комплексної морфологічної диференційної діагностики між МКГН I типу та ДВГН доцільно використовувати такі ІГХ показники: віментин та α -гладком'язовий актин, що залучаються до прогресування гломерулосклерозу та інтерстиціального фіброзу.

2. При оцінюванні морфометричних даних експресії віментина та α -гладком'язового актину у клубочках виявлено, що кількість віментин-позитивних клітин та їхня питома вага при МКГН I типу ($975,8 \pm 116,8$ клітин

на 1 мм^2 та $16,6\% \pm 3,7$ відповідно) була вищою, ніж при ДВГН ($510,6 \pm 69$ клітин на 1 мм^2 та $10,2\% \pm 3,3$ відповідно), а кількість та питома вага актин-позитивних клітин – вищою при ДВГН ($769,1 \pm 124,8$ клітин на 1 мм^2 та $11,6\% \pm 4,4$ відповідно), ніж при МКГН I типу ($706,5 \pm 112,4$ та $7,9\% \pm 1,4$). Однак статистично значущою ($p < 0,05$) була різниця тільки питомих ваг віментин-позитивних клітин у клубочках. Морфометричні дані стосовно віментин-позитивних клітин у клубочку свідчать на користь прогресування і хронізації МКГН, це слід враховувати при призначенні лікувальних режимів і прогнозуванні ГН

3. У стромі кількість і питома вага віментин-позитивних клітин при МКГН I типу ($830 \pm 107,6$ клітин на 1 мм^2 та $7,8\% \pm 1,3$ відповідно) превалювала над такими самими показниками при ДВГН ($510,6 \pm 69$ клітин на 1 мм^2 та $6,4\% \pm 2,5$), кількість актин-позитивних клітин у стромі при МКГН I типу була вищою, ніж при ДВГН ($519,5 \pm 37,5$ та $507,4 \pm 67,6$ клітин на 1 мм^2 відповідно), а питома вага – вищою при ДВГН ($12,7\% \pm 4,9$ та $8,2\% \pm 1,6$ відповідно). Статистично значущою ($p < 0,05$) була різниця тільки кількості віментин-позитивних клітин у стромі. Морфометричні дані щодо віментин-позитивних клітин і превалювання їх при ДВГН показують більш виразне ураження інтерстиціального компонента та можуть відіграти роль несприятливого прогностичного чинника.

Дані, що одержали, свідчать: диференційна діагностика між цими нефропатіями доволі складна, прогноз і відповідь на патогенетичну терапію потребують комплексного морфологічного дослідження ниркових біопатів із використанням ІГХД, зокрема й вивчення складу сполучної тканини для призначення адекватної терапії та прогнозування ГН.

Перспективи подальших досліджень полягають у поглибленому вивченні інших складових сполучної тканини в різних структурах нирки для призначення таргетної терапії хворим на хронічні форми ГН.

Список літератури

1. Іванова М.Д. Імуногістохімічні маркери інтерстиціального фіброзу при первинних проліферативних гломерулонефритах / М.Д. Іванова // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2012. – Спец. випуск №1. – С. 229.
2. Руководство по нефрологии / под ред. А.И. Дядька, Е.А. Дядык. – К. : Четверта хвиля, 2011. – 600 с.
3. Морфологические критерии в прогнозировании течения и исхода гломерулонефритов / Е.А. Дядык, Т.В. Шатохина, М.Д. Иванова и др. // Морфологичний стан тканин і органів систем організму в нормі та патології : зб. матеріалів науково-практ. конф. – Тернопіль, 2009. – С. 54–55.
4. Возможности застосування сучасних методів морфологічної діагностики прижиттєвого дослідження нирок хворих на різні форми гломерулонефритів / О.О. Дядик, І.В. Василенко, Т.В. Шатохіна [та ін.] // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – 2009. – №1(10). – С. 45–48.
5. Beck L. Glomerular and tubulointerstitial diseases / L. Beck, D. Salant // Prim. Care Office Pract. – 2008. – Vol. 35. – P. 264–296.
6. Diagnostic Pathology: Kidney Diseases / edit. : R.B. Colvin, A. Chang, N. Kambham. – Boston : Lippincott Williams &

Wilkins Publisher, 2011. – 1000 p.

7. Christensen E. Interstitial fibrosis: tubular hypothesis versus glomerular hypothesis / E.I. Christensen, P.J. Verroust // Kidney International. – 2008. – Vol. 74. – P. 1233–1236.
8. Eddy A.A. Scraping fibrosis: UMODulating renal fibrosis / A.A. Eddy // Nat. Med. – 2011. – Vol. 17. – №5. – P. 553–555.
9. Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation of renal tubular epithelial cells induced by urinary proteins requires the activation of PKC- α and β 1 isozymes / R. Tang, C. Yang, J.L. Tao et al. // Cell Biol. Int. – 2011. – Vol. 35. – №9. – P. 953–959.

References

1. Ivanova, M. D. (2012). Immunohistochemical markers of interstitial fibrosis in primary proliferative glomerulonephritis. [Immunohistochemical markers of interstitial fibrosis in primary proliferative glomerulonephritis]. Ukrainian journal of medical science, 1, 229. [in Ukrainian].
2. Dyadyk, A. I., & Dyadyk, E. A. (Eds) (2011). Rukovodstvo po nefrologii. [Manual on nephrology]. Kyiv: Chetverta khvylya. [in Ukrainian].

3. Dyadyk, E. A., Shatokhina, T. V., Ivanova, M. D., & Khmara, E. V. (2009) Morfologicheskie kriterii v prognozirovanii techeniya i iskhoda glomerulonefritov [Morphological criteria in predicting the course and outcome of glomerulonephritis]. Morfolohichniy stan tkanyn i orhaniv system orhanizmu v normi ta patolohii Proceedings of the Scientific and Practical Conference, (pp. 54–55). Ternopil. [in Ukrainian].
4. Dyadyk, O. O., Vasylenko, I. V., Shatokhina, T. V., Ivanova, M. D., & Khmara, E. V. (2009). Mozhyvosti zastosuvannya suchasnykh metodiv morfolohichnoi diahnostryky pry zhyttievoho doslidzhennia nyrok khvorykh na rizni formy hlo-merulonefrytu [Possibilities of application of modern methods of diagnosis in vivo morphological study of the kidneys of patients with various forms of glomerulonephritis]. Zdobutky klinichnoi ta eksperymentalnoi medytsyny, 1(10), 45–48. [in Ukrainian].
5. Beck, L., & Salant, D. (2008). Glomerular and tubulointerstitial diseases. Prim. Care Office Pract., 35, 264–296.
6. Colvin, R. B., Chang, A., & Kambham, N. (2011). Diagnostic Pathology: Kidney Diseases. Boston: Lippincott Williams & Wilkins Publisher.
7. Christensen, E. I., & Verroust, P. J. (2008). Interstitial fibrosis: tubular hypothesis versus glomerular hypothesis. Kidney International, 74, 1233–1236.
8. Eddy, A. A. (2011). Scraping fibrosis: UMODulating renal fibrosis. Nat. Med., 17(5), 553–555.
9. Tang, R., Yang, C., Tao, J. L., You, Y. K., An, N., Li S. M., et al. (2011). Epithelial-mesenchymal transdifferentiation of renal tubular epithelial cells induced by urinary proteins requires the activation of PKC-alpha and betaI isozymes. Cell Biol. Int., 35, 953–959.

Відомості про авторів:

Хмара О.В., лікар-патологоанатом, ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН України»,

E-mail: khmara_e_v@mail.ru.

Дядик О.О., д. мед. н., професор каф. патанатомії, Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця.

Надійшла в редакцію 13.10. 2014 р.

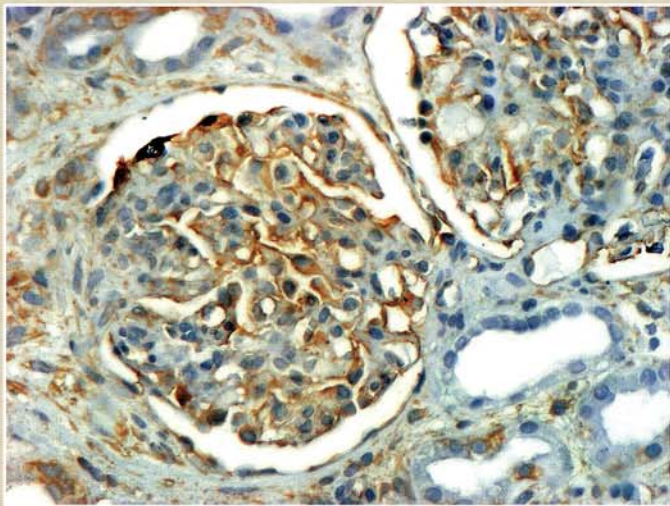


Рис. 1. МКГН I типа, позитивне забарвлення на віментин у капілярних петлях та ділянках мезангіуму, в деяких клітинах канальців та ділянково – в стромі. Система візуалізації DAKO Advance x150.

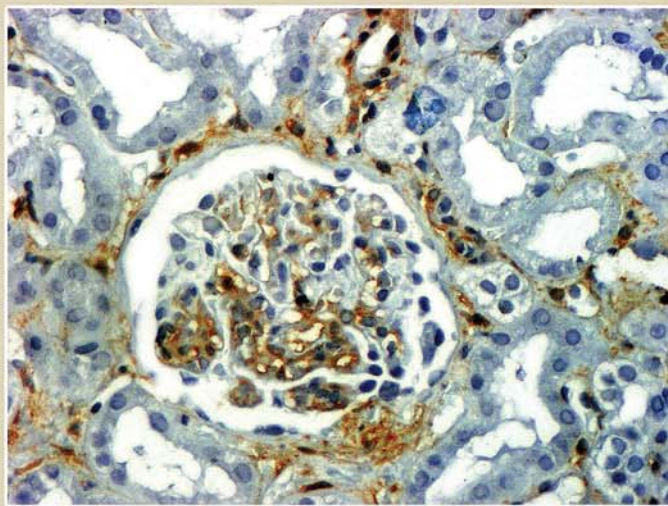


Рис. 2. ДВГН, α SMA-позитивне забарвлення в клубочку, в ділянках «півмісяця» та базальної мембрани капсули Боумена, перигломерулярно, в поодиноких клітинах епітелію канальців, в стромі. Система візуалізації DAKO Advance x150.

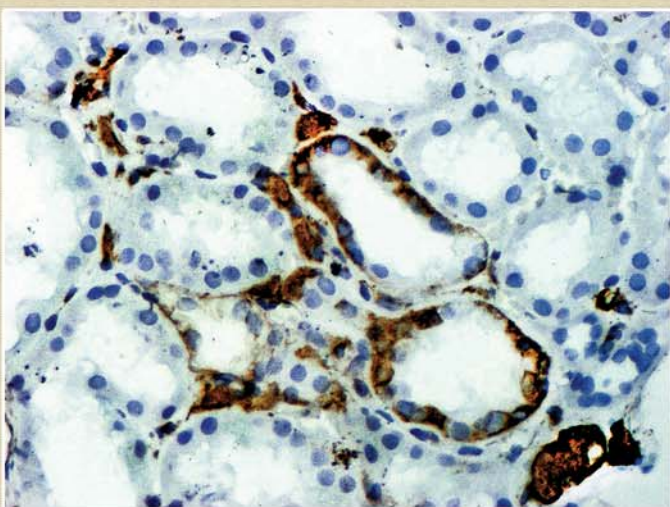


Рис. 3. ДВГН, ділянкове виразне забарвлення віментину в епітелії частин канальців та інтертубулярно. Система візуалізації DAKO Advance x150.

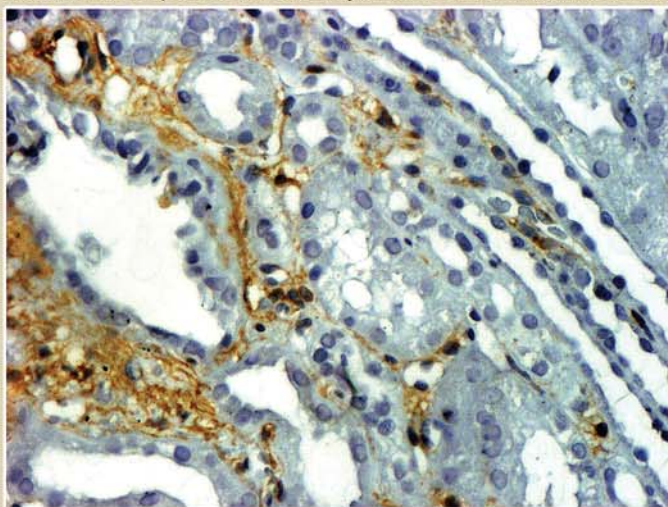


Рис. 4. МКГН I типа, перитубулярне та інтертубулярне α SMA-позитивне забарвлення в інтерстиції. Система візуалізації DAKO Advance x150.

(Рис. 1–4 до статті О. В. Хмари, О. О. Дядик «Імуногістохімічні особливості деяких складових сполучної тканини нирок при мезангіокапілярному гломерулонефриті I типу та дифузному вовчаковому гломерулонефриті», с. 60–63)

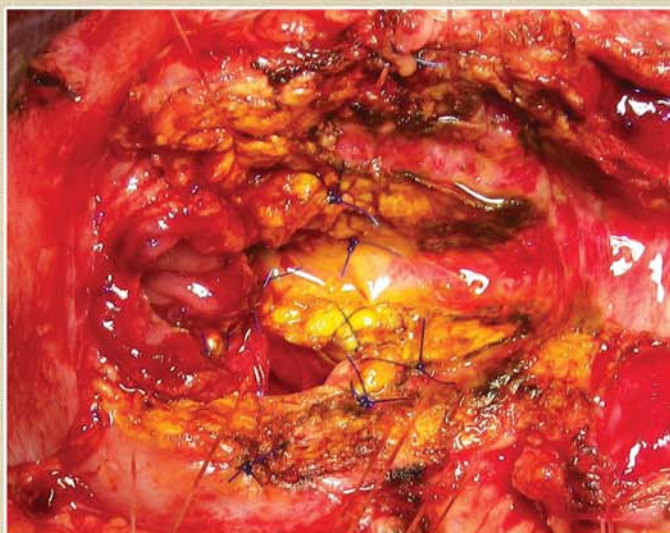


Рис. 2. Сформированная «протоковая площадка».

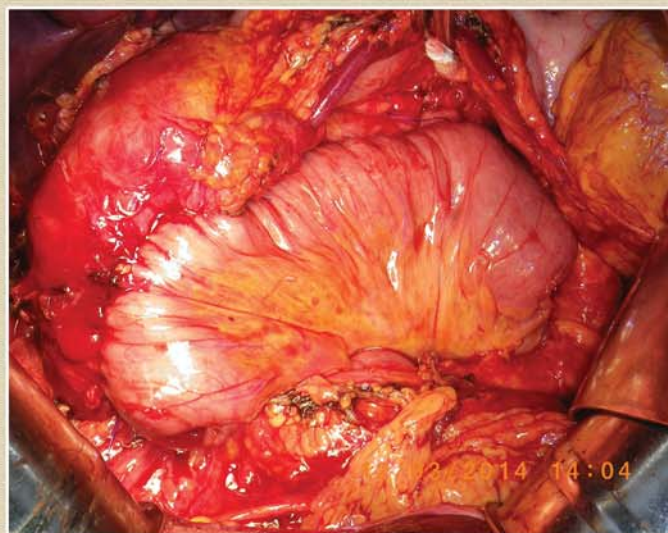


Рис. 3. Сформированный изолированный панкреатикоеюно-дуоденоанастомоз.

(Рис. 2–3 к статье В. Н. Клименко, А. В. Клименко, А. А. Стешенко «Сравнительная оценка и технические аспекты панкреатодигестивных анастомозов при выполнении паренхимосохраняющих операций у больных хроническим панкреатитом с протоковой гипертензией», с. 51–54)