

© Т.С.Сметанникова, А.А.Гумерова, А.С.Хайруллов, А.П.Киясов, 2005
УДК 616.61-002-036.12:612.119

Т.С. Сметанникова, А.А. Гумерова, А.С. Хайруллов, А.П. Киясов

УЧАСТИЕ КРОВЕТВОРНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЧКИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ

T.S. Smetannikova, A.A. Gumerova, A.S. Khajrullova, A.P. Kiyasov

INVOLVEMENT OF HEMOPOIETIC STEM CELLS IN REGENERATION OF THE KIDNEY IN CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

Кафедра нормальной анатомии Казанского государственного медицинского университета, Татарстан, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: изучить возможность участия кроветворных стволовых клеток в регенерации почки при хроническом гломерулонефрите (ХГН) с различной степенью морфологической активности ХГН. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследования проведены на материале 64 нефробиопсий больных ХГН. Патоморфологическую оценку активности ХГН и выраженности (склероза) осуществляли полуколичественным методом. Иммуногистохимическое исследование нефробиоптатов проводили с использованием моноклональных антител против α -ГМА, CD31, CD34 стрептовидинбиотиновым методом (LSAB-kit компании, DAKO). α -ГМК-актин-маркер миофибробластов, синтезирующих компоненты соединительной ткани. CD31-маркер эндотелия, CD34 – эндотелия и гемопоэтических стволовых клеток. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** При минимальной степени активности ХГН, количество клеток, экспрессирующих CD34 в 18,75% случаев превышало количество клеток, экспрессирующих CD31. Экспрессия α -ГМА миофибробластам выявлена в 28%. При умеренной степени активности повышенная экспрессия CD34 встречалась в 46,15% случаев. Миофибробласты α -ГМА+ выявлены во всех нефробиопсиях. При средней активности ХГН клеточная экспрессия CD34 превышала CD31 в 50%. При высокой степени активности уровень экспрессии CD34 был равен уровню экспрессии CD31. Возможное участие в регенераторном ответе кроветворных стволовых клеток определяли по разнице экспрессии CD31 и CD34. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Кроветворные стволовые клетки с фенотипом CD34+ могут принимать участие в регенерации почки при ХГН.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, регенерация почки, CD31, CD34, стволовые клетки.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study possible involvement of hemopoietic stem cells in regeneration of the kidney in chronic glomerulonephritis (CGN) with different degrees of morphological activity of CGN. **MATERIALS AND METHODS.** The investigations were performed with the material of 64 nephrobiopsies of CGN patients. Pathomorphological assessment of CGN activity and degree of sclerosis was fulfilled by a semiquantitative method. The immunohistochemical investigation of nephrobiopsates was carried on using monoclonal antibodies against α -smooth muscle actin (α -SMA), CD31, CD34 streptavidinbiotin method (LSAB-kit company, DAKO), α -SMC-actin marker of myofibroblasts synthesizing components of the connective tissue, CD31-marker of endothelium, CD34 – of the endothelium and hemopoietic stem cells. **RESULTS.** The number of cells expressing CD34 in 18.75% of cases under condition of minimal degree of CGN activity exceeded the number of cells expressing CD31. Expression of α -SMA by myofibroblasts was detected in 28%. In cases of mild degree of activity the higher expression of CD34 took place in 46.15% of cases. Myofibroblasts of α -SMA+ were found in all nephrobiopsies. In average activity of CGN the cell expression of CD34 was 50% higher than CD31. In high degree of activity the level of CD34 expression was equal to that of CD31. Possible participation in the regenerative response of hemopoietic stem cells was determined by difference of expression of CD31 and CD34. **CONCLUSION.** Hemopoietic stem cells with phenotype CD34+ can be involved in regeneration of the kidney in CGN.

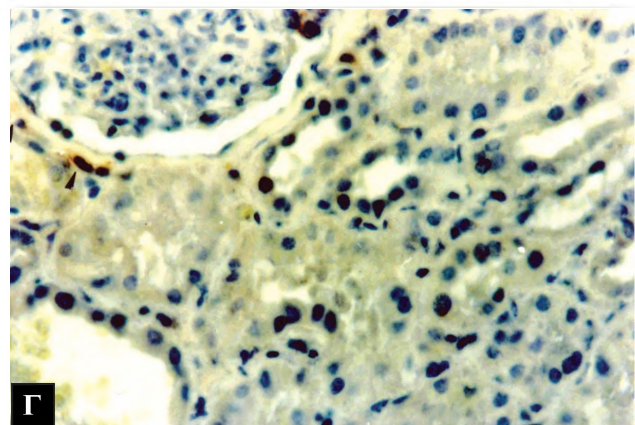
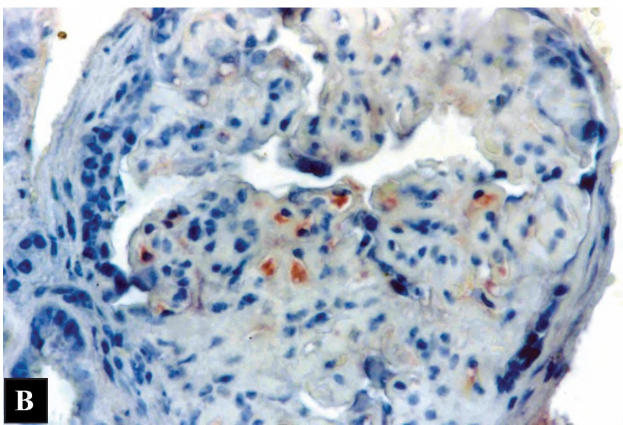
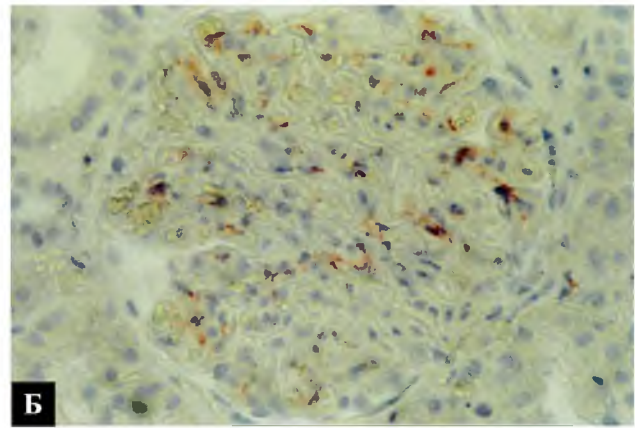
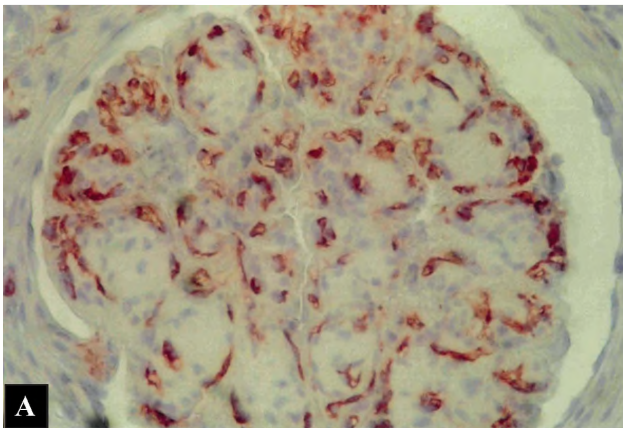
Key words: chronic glomerulonephritis, regeneration of the kidney, CD31, CD34, stem cells.

ВВЕДЕНИЕ

Хронический гломерулонефрит (ХГН) – это хроническое иммуновоспалительное заболевание почек с первоначальным и преимущественным поражением клубочков и прогрессирующим течением, исходом которого являются нефросклероз и почечная недостаточность [1].

Одной из важнейших функций организма является его способность замещать поврежденные или погибшие клетки. Регенерация почки обычно происходит за счет деления специализированных клеток органа [2] и завершается восстановлением нормальной структуры ткани (регенерация по типу

реституции). Однако в ряде случаев, тканевого регенераторного резерва не хватает и в органе появляются миофибробласты, экспрессирующие альфа-гладкомышечный актин (α -ГМА) и синтезирующие макромолекулы соединительной ткани [3], что может привести к формированию склероза почечной ткани (регенерация по типу субституции). В настоящее время показано, что при остром повреждении в регенерации почки у лабораторных животных принимают участие не только специализированные клетки, но и стволовые клетки, циркулирующие в периферической крови и имеющие фенотип CD34+, CD38-, Lin- [4–7].



Нефробиопсии больных ХГН, окрашенных иммуногистохимически антителами к CD34 (А), CD31 (Б), α -ГМА (В, Г). Продукт иммуногистохимической реакции красного цвета. х 400. А – Экспрессия CD34 клетками клубочка; Б – экспрессия CD34 клетками клубочка; В – умеренный склероз клубочков. Миофибробластическая трансдифференцировка мезангиальных клеток; Г – выраженный склероз клубочков. Единичные миофибробласты в клубочке.

Основной целью данного исследования было установить, участвуют ли кроветворные стволовые клетки в регенерации почки при ХГН, и существует ли зависимость между активацией стволового компонента и степенью морфологической активности ХГН.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на материале 64 нефробиопсий больных ХГН, выполненных в нефрологическом и патологоанатомических отделениях РКБ МЗ РТ. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин, готовили серийные срезы толщиной 5-6 мкм. Патоморфологическую оценку активности ХГН и выраженности склероза осуществляли полуколичественным методом [8]. При оценке индекса активности ХГН учитывали следующие признаки: интракапиллярная инфильтрация, полулуния, мезангиальная пролиферация, пролиферация подоцитов, нейтрофильная инфильтрация, депозиты, наличие тромбоцитов, кариорексис. При оценке индекса склероза учитывали наличие сморщенных клубочков, сегментарный склероз, синехии, перигломерулярный склероз и гиалиноз. Каждый признак оценивали в баллах (0 – отсутствие изменений, 1 – минимальные изме-

нения, 2 – умеренные изменения, 3 – максимальные).

Иммуногистохимическое исследование нефробиоптатов проводили с использованием моноклональных антител против альфа-гладкомышечного актина (маркер миофибробластов), CD31 (маркер эндотелиальных клеток) и CD34 (маркер эндотелиальных и стволовых клеток) стрептовидинбиотиновым методом с использованием LSAB-kit компании DAKO [9].

Полуколичественную оценку выраженности экспрессии CD31, CD34, α -ГМК-актин проводили на серийных срезах три независимых морфолога по схеме: высокая активность – около 70% клеток экспрессируют искомый антиген, средняя активность – около 50%, ниже средней – 35%, низкая – менее 15% клеток экспрессируют искомый антиген.

Возможное участие в регенераторном ответе кроветворных стволовых клеток определяли по разнице экспрессии CD31 и CD34.

Статистический анализ результатов исследований проводили с помощью вариационной статистики с вычислением средних величин ($\bar{X}$), среднего квадратического отклонения (SD) и средней ошибки (m) средней величины. Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нефробиопсии были поделены на 4 группы в зависимости от степени активности ХГН.

В первой группе (n=29) с индексом активности 1-2 балла (минимальная активность) в 18,75% случаев уровень экспрессии CD34 в клубочках был выше уровня экспрессии CD31. В 28% случаев выявлена экспрессия α -ГМА (рис. А, Б). Индекс склероза составил 1-2 балла (минимальный склероз).

Во второй группе (n=12) с индексом активности 3-4 балла (умеренная активность) повышенная экспрессия CD34 по сравнению с CD31 наблюдалась в 46,15% случаев. Экспрессия α -ГМА выявлена во всех случаях. Индекс склероза составил 3-5 баллов (умеренный склероз) (рис. В, Г).

В третьей группе (n=13) с индексом активности ХГН 5-6 баллов (средняя активность) в 50% случаев экспрессия CD34 превышала экспрессию CD31. В 88% случаев наблюдали экспрессию α -ГМА. Индекс склероза – 7 баллов (выраженный склероз).

В четвертой группе с индексом активности более 7 баллов (10 биопсий), уровень экспрессии CD34 был равен уровню экспрессии CD31 во всех случаях. В этой группе экспрессия α -ГМА выявлена в 29% случаев. Индекс склероза составил 10-18 баллов (выраженный склероз).

ОБСУЖДЕНИЕ

Долгое время считалось, что восстановление целостности почечной ткани происходит только за счет деления клеток самой почки. Однако недавно было установлено, что регенерация почки происходит не только в результате стимуляции миграции и пролиферации резидентных мезангиальных и эндотелиальных клеток, но и за счет вовлечения в регенераторный ответ кроветворных стволовых клеток [4-7,10,11]. Эти данные были получены при моделировании острой почечной патологии на различных животных (повреждением гетерологическими антипочечными сыворотками, либо путем нарушения перфузии почечной ткани). Нас же заинтересовал вопрос, что происходит с кроветворными стволовыми клетками при хроническом гломерулонефрите у человека? Участвуют ли они в регенерации при данной патологии?

Результаты исследования окрашенных на CD31 и CD34 серийных срезов показали, что из 64 нефробиопсий в 22 случаях экспрессия CD34 более интенсивна, чем экспрессия CD31, т.е. только в трети случаев можно предположить участие в регенерации почки кроветворных стволовых клеток. Поскольку в исследованной группе были разные

по степени активности и стадии ХГН, мы решили проверить, зависит ли вовлечение стволовых клеток в регенераторный ответ от морфологической активности ХГН (т.е. выраженности некроза и воспаления в почке)?

Мы установили, что уже при минимальной активности ХГН наблюдается участие кроветворных стволовых клеток (CD34+) в регенераторном ответе. Это участие становится более выраженным при умеренной и средней степени активности ХГН. Однако при высокой степени активности ХГН разница между уровнем экспрессии CD31 и CD34 не определяется, т.е. при помощи антител выявляются только эндотелиальные клетки. Т.о. при максимальной степени активности ХГН кроветворные стволовые клетки не принимают участия в регенерации клубочка. Можно предположить, что отсутствие кроветворных стволовых клеток в регенераторном процессе при высокой степени активности связано с тем, что регенерация в этом случае протекает не по пути реституции с полным восстановлением структуры и функции почечной паренхимы, а по пути субституции, когда погибшие клетки заменяются соединительной тканью и формируется гломерулосклероз с прогрессирующей почечной недостаточностью [12]. Наше предположение подтверждается результатами исследований функций почек. Скорость клубочковой фильтрации у 70% таких больных была резко снижена и составила в среднем $48,69 \pm 3,2$ мл/мин, тогда как у больных с меньшей степенью активности скорость клубочковой фильтрации была в пределах нормы.

Современные представления о регуляции фиброгенеза указывают на то, что различия между заживлением с восстановлением нормальной структуры и функции и развитием фиброза ткани являются следствием локального дисбаланса в сложной цепи событий, происходящих в ходе репарации. Последняя представляет собой взаимодействие между гломерулярными и инфильтрирующими клубочек клетками, выделение ряда медиаторов, стимулирующих дальнейшее повреждение клеток и их пролиферацию, накопление матрикса и недостаточную утилизацию его избытка. Особая роль в этом процессе принадлежит таким факторам роста, как трансформирующий фактор роста β , тромбоцитарный фактор роста β , основной фактор роста фибробластов, интерлейкины 6, 1 β , ангиотензин-2 [13].

Учитывая вышесказанное, мы проанализировали индекс склероза в группе биопсий со степенью активности ХГН более 7 баллов, и установили, что индекс склероза данных биопсии находится в пределах от 10 до 18 баллов, что соответствует

выраженному склерозу клубочков. То есть, как мы и предполагали, при высокой степени активности регенерация клубочков протекает по пути субституции, и этот процесс происходит без участия как региональных, так и кроветворных стволовых клеток. По всей вероятности, это связано с тяжестью эндотелиального повреждения, развитием склероза микрососудов, снижением выработки тромбоцитарного фактора роста и фактора роста фибробластов, играющих большую роль в миграции кроветворных стволовых клеток, а также со снижением выработки фактора стволовых клеток, ответственного за привлечение и созревание КСК [13].

Известно, что основным клеточным источником компонентов соединительной ткани в почке при развитии нефросклероза являются миофибробласты [12]. Миофибробласты представляют собой не что иное, как трансформированные мезангиальные клетки. В период прогрессирования гломерулосклероза, мезангиальные клетки под воздействием трансформирующего фактора роста $\beta 1$ начинают пролиферировать и продуцировать интерстициальный коллаген 1 и 3 типов, который не обнаруживается в здоровых клубочках [13,14], в результате чего происходит изменение состава матрикса с появлением нехарактерных для нормальной почки матриксных белков.

Мы проанализировали зависимость между степенью активности ХГН и участием миофибробластов (активированных мезангиальных клеток) в регенераторном процессе. Оказалось, что в группах с индексом активности 3-4 и 5-6 баллов миофибробластическая трансдифференцировка была максимальной (88-100%), по сравнению с группами с более низким и высоким индексами активности ХГН. Соответственно, можно сделать вывод, что при умеренной и средней степени активности трансдифференцировка мезангиальных клеток в миофибробласты происходит наиболее интенсивно. Это можно объяснить следующим образом: при минимальной степени активности регенерация происходит за счет деления специализированных клеток и необходимости в активации миофибробластов не возникает. При более тяжелом и/или длительном повреждении появление миофибробластов, обладающих ярко выраженными сократительными способностями и синтезирующих макромолекулы межклеточного вещества, необходимо для уменьшения размеров образовавшихся в результате некрозов клеток нефрона «пустот». Сократительная активность миофибробластов приводит к уменьшению дефектов ткани, а синтезируемые ими компоненты соединительной ткани заполняют эти дефекты, после чего необходимость в их деятель-

ности исчезает, и миофибробласты не обнаруживаются в очагах склероза [12,13].

При анализе полученных результатов также было отмечено, что увеличение экспрессии α -ГМА происходит параллельно с увеличением количества кроветворных стволовых клеток и индекса активности ХГН. При минимальной степени активности процесс гломерулярной репарации и восстановление нормальной архитектуры клубочка происходит за счет деления специализированных клеток повышенной продукции физиологического матрикса; трансдифференцировка при этом незначительная. В дальнейшем происходит постепенное снижение тканевого регенераторного резерва, что приводит с одной стороны к миофибробластической трансдифференцировке мезангиальных клеток, с другой стороны к вовлечению в процесс регенерации кроветворных стволовых клеток. Активация миофибробластов и стволовых клеток максимальна при умеренной и средней степенях активности ХГН (3-6 баллов). Мы предполагаем, что именно в это время решается вопрос, пойдет процесс восстановления по пути реституции, либо по пути субституции. Если резерв стволовых клеток будет достаточным и мезангиальные клетки будут синтезировать преимущественно нормальные матриксные белки, то будет восстанавливаться нормальная структура ткани. Если же повреждение будет продолжаться, количество стволовых клеток будет недостаточным и мезангиальные клетки будут трансдифференцироваться и синтезировать нефизиологичный коллаген 1 и 3 типов, в результате чего будет формироваться склероз почки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе наших исследований мы выявили, что кроветворные стволовые клетки участвуют в регенерации почки при ХГН. ХГН умеренной и средней активности это тот рубеж в регенерации нефрона, когда идет явная борьба между тем, пойдет процесс восстановления по пути реституции, либо по пути субституции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Тареева И.Е. (ред.) *Нефрология: Руководство для врачей*. Медицина, М., 2000; 215-239
2. Nahas AMEI, Muchaneta-Kubara EC, Essaway M, Soylemezoglu O. Renal fibrosis: Insights into pathogenesis and treatment. *Int J Biochem Cells Biol* 1997; 29(1): 55-62
3. Gonlusen G, Ergin M, Paydas S, Tunali N. The expression of cytoskeletal proteins (alpha-SMA, vimentin, desmin) in kidney tissue: a comperison of fetal, normal kidneys, and glomerulonephritis. *New Engl J Med Int Urol Nephrol* 2001; 33(2): 299-305
4. Ito T. Stem cells of adult kidney; where are you from? *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 641-644
5. Rookmaaker MB, Smits A, Tolboon M et al. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair

in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2003; 163: 553-562

6. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3138-3146

7. Imai E, Ito T. Can bone marrow differentiate into renal cells? *Pediatr Nephrol* 2002; 17(10): 790-794

8. Polenakovic M. Glomerular sclerotic area and severity of tubulointerstitial changes – their prognostic significance in IgA nephropathy. XXXV Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant Association June 6-9, Italy, 1998; 112

9. Киясов АП. *Современные технологии морфологических исследований*. Казань, Казанский государственный медицинский университет, 2001

10. Suzuki A, Iwatani H, Ito T et al. Platelet-derived growth factor plays a critical role to convert bone marrow cells into glomerular mesangial-like cells. *Kidney Int* 2004; 65: 15-24

11. Al-Awgati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney. *Kidney Int* 2002; 61:382

12. Badid C, Mounier N, Costa AM, Desmouliere A. Role of myofibroblasts during tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. *Histol Histopathol* 2000; 15(1): 269-80

13. Nahas AMEI. Plasticity of kidney cells: Role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int* 2003; 64: 1553-1563

14. Sasaki S, Nishihira J, Ishibashi T et al. Transgene of MIF induces podocyte injury and progressive mesangial sclerosis in the mouse kidney. *Kidney Int* 2004; 65: 469-481

Поступила в редакцию 12.07.2005 г.