

© В.Г.Сиповский, В.А.Добронравов, А.Корунная, А.В.Смирнов, 2013
УДК 616.61:576.807.7

В.Г. Сиповский¹, В.А. Добронравов¹, А.В. Корунная¹, А.В. Смирнов¹

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕРИТУБУЛЯРНЫХ МИКРОСОСУДОВ ИНТЕРСТИЦИЯ ПОЧЕК У БОЛЬНЫХ IgA-НЕФРОПАТИЕЙ (IgAN) С ОЦЕНКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКТИНОВОГО ПУТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

V.G. Sipovskiy, V.A. Dobronravov, A.V. Karunnaya, A.V. Smirnov

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF CHANGES OF PERITUBULAR MICROCIRCULATION VESSELS OF KIDNEY INTERSTITIAL TISSUE IN PATIENTS WITH IGA-NEPHROPATHY (IGAN) WITH ESTIMATION OF LECTIN PATHWAY OF COMPLEMENT ACTIVATION

¹НИИ нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

Проведено обследование группы больных с IgA нефропатией (IgAN) с анализом воспалительно-склеротических изменений в тубулоинтерстиции (ТИН), а также иммуногистохимической активности C4d – маркера активации лектинового пути комплемента. Количественно и полуколичественно оценивались иммуноглобулины IgG, IgM, IgA, фракции комплемента C1q, C3c, фибриноген, легкие цепи kappa и lambda, количество микрососудов, ТИН с позитивной реакцией на C4d в эндотелии, экстракапиллярная пролиферация, глобальный и сегментарный склероз, мезангиальная пролиферация, интерстициальный фиброз, количество капилляров в ТИН с лейкоцитами – перитубулярный капиллярит (ПТК), также возраст, пол, суточная протеинурия и сывороточный уровень креатинина, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по MDRD. В результате были получены данные об активации лектинового пути комплемента в перитубулярных микрососудах, что сопровождается воспалительной реакцией в них и более тяжелым клиническим течением.

Ключевые слова: IgA-нефропатия, лектиновый путь активации комплемента, тубулоинтерстиций.

ABSTRACT

The study of a group of patients with IgA-nephropathy (IgAN) was performed with detailed analysis of inflammatory and sclerotic changes in the tubulointerstitium (TIN). As well as immunohistochemical analysis of activity C4d – MBL activation marker of complement pathway. Quantitatively and semiquantitatively were estimated immunoglobulins (IgG, IgM, IgA), complement fractions C1q, C3c, fibrinogen, kappa light chains and lambda deposition, the number of TIN microvessels with – C4d – positive reaction in endothelium. Extracapillary proliferation, global and segmental sclerosis, mesangial proliferation, interstitial fibrosis, the number of peritubular capillaries in the TIN with leukocytes-peritubular capillaritis (PTC), the age, sex, daily proteinuria and serum creatinine, glomerular filtration rate (GFR) by MDRD were evaluated. As a result we have obtained the data about inflammatory activity in TIN microvessels of some patients under IgAN that may signify the partial activation the lectin complement pathway and the more severe clinical course.

Key words: IgA-nephropathy, lectin pathway of complement activation, tubulointerstitium.

ВВЕДЕНИЕ

IgA-нефропатия (IgAN) до настоящего времени является наиболее часто встречаемым вариантом первичных гломерулопатий [1]. Заболевание характеризуется вариабельной клинической картиной и через 20–25 лет в 15–40% случаев формируется терминальная почечная недостаточность, требующая проведения заместительной почечной терапии [2, 3].

Известно, что ключевым патоморфологическим признаком IgAN является отложение IgA (IgA1 и/или IgA2) в составе иммунных депозитов в мезангиальном матриксе, в связи с чем общепринято считать, что это ведет к локальной активации системы комплемента и мезангиальных клеток [4]. Следует отметить пути активации систем комплемента при IgAN могут быть различными в рамках уже общеизвестных: классического, альтернативного или лектинового [5]. При этом активация лектинового пути системы комплемента (активация посредством

Сиповский В.Г. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 12.
ГОУ ВПО СПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова. Тел/факс: (812) 234-67-23,
e-mail: sipovski@mail.ru

маннозо-связующего лектина: MBL-пути), который иммуногистохимически характеризуется выявлением в структурах почек C4d, MBL, MASP-1, на настоящий момент считается неблагоприятным предиктором по сравнению с классическим или альтернативным путями [6]. Однако практически во всех ранее проведенных работах по изучению активации MBL-пути комплемента при IgAN исследовались в гломерулярных структурах, в частности в мезангии [6]. В то же время существенное значение воспалительно-склеротических изменений (ВСИ) ТИН в прогрессировании гломерулопатий общеизвестно [9] и, кроме того, имеются свидетельства того, что при IgAN и болезни Шенляйна-Геноха отмечаются отложения IgA в тубулоинтерстиции (ТИН), сочетающиеся с ВСИ [7, 8].

В связи с вышеизложенными данными целью данной работы было исследование группы больных с IgAN с более детальным анализом ВСИ ТИН, чем это обычно осуществляется в рутинной практике, вместе с оценкой иммуногистохимической активности C4d – маркера MBL-пути активации комплемента с целью получения дополнительных патоморфологических предикторов клинического течения IgAN.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 10 пациентов с диагнозом IgAN, находившиеся на лечении в клинике пропедевтики внутренних болезней СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в 2011 году, у которых проводилось морфологическое исследование биоптатов почек. Диагноз IgAN устанавливался после гистологического светооптического исследования срезов нефробиоптата при окрасках гематоксилином и эозином, ШИК-реакцией, по Массону и серебрением по Джонсу, а также иммунофлюоресцентного исследования криостатных срезов с FITC-мечеными антителами к иммуноглобулинам IgG, IgM, IgA, фракциям комплемента c1q, C3c, фибриногену, легким цепям kappa и lambda (DAKO). Результаты проведения реакции оценивались полуколичественно в микроскопе «IMAGER Z2» (ZEISS, Германия) по локализации, интенсивности свечения (0 – нет, 1 – незначительное, 2 – умеренное, 3 – выраженное) и распространенности (0 – нет, 1 – до 25%, 2 – до 50%, 3 – более 50% объема исследованной структуры).

Клинико-лабораторные данные были обобщены и проанализированы по следующим критериям: возраст, пол, наличие или отсутствие гипертензии (артериальное давление > 140/90 мм рт. ст. или использование антигипертензивных медикаментов),

суточная протеинурия и сывороточный уровень креатинина, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по MDRD.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводилось на 3–4 микронных депарфинизированных и регидратированных срезах нефробиопсий, фиксированных в забуференном 4% параформальдегиде pH 7,2–7,4, с использованием поликлональных готовых к использованию антител к человеческой C4d-фракции комплемента («Abcam», Англия). Для высокотемпературной демаскировки антигенов использовался раствор 10 mM, pH 6 («Dako», Дания) с инкубацией стекол со срезами в микроволновой печи при 800 Wt в течение 10 мин. Для детекции иммуногистохимической реакции использовалась система визуализации «EnVision HRP» («Dako», Дания) в соответствии со следующим протоколом: блок эндогенной пероксидазы с 3% H₂O₂ на фосфатном буфере pH 7,2–7,4 в течение 20 мин, при комнатной температуре, отмывка в фосфатном буфере в течение 3 мин, применение диаминобензидиновой (DAB) реакции для маркирования конъюгата в течение 5 мин, отмывка срезов в проточной воде в течение 10 мин и заключение в водную среду.

Продукт иммуногистохимической реакции учитывался как количество микрососудов ТИН с позитивной реакцией на C4d в эндотелии (рис. 1 Е) в 20 неперекрывающихся полях зрения при увеличении X 40, с исключением из подсчета гломерул и крупных сосудов. В результате больные подразделялись на группу 1 – C4d-позитивные (+), продукт реакции имеется более 1% от общего числа капилляров ТИН и группу 2 – C4d-негативные (–), продукт реакции имеется до 1% от общего числа капилляров ТИН.

Экстракапиллярная пролиферация, глобальный и сегментарный склероз были подсчитаны как процент от общего числа клубочков. Активность мезангиальной пролиферации оценивалась от 0–3: 1 – незначительная (до 4 клеток), 2 – умеренная (4–8 клеток) и 3 – выраженная (более 8 клеток) на лобулу. Интерстициальный фиброз оценивался полуколичественно: 0 – отсутствие склероза, 1 – до 25% ТИН, 2 – до 50% ТИН, 3 – более 50% объема ТИН (рис. 2, Б).

Количество капилляров в ТИН с лейкоцитами-перитубулярный капиллярит (ПТК) при наличии в просвете > 2 шт. определялся как процент от общего числа капилляров ТИН (рис. 2, А). В зависимости от количества ПТК выделялись группы: 0 – с отсутствием ПТК, 1 – до 5% ПТК или незначительное количество, 2 – более 5% ПТК или

Таблица 1

**Тубулоинтерстициальные депозиты
С3с и фибриногена у пациентов с IgAN
в 1-й и 2-й группах**

Распространенность/интенсивность реакции	С3с	Фибрин
С4d-позитивные группа 1 (% , n=5)	2/2	2/2
С4d-негативные группа 2 (% , n=5)	0/0	0/0

значимое количество. Измерения проводились в 20 неперекрывающихся полях зрения при увеличении 40 с исключением из подсчета гломерул и крупных сосудов (рис. 2, Б).

Результаты представлены в виде относительных показателей – «%» и средних значений (М) ± стандартное отклонение (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из полученных после проведения нефробиопсийного исследования в 2011 году стекла с подтвержденным диагнозом IgAN были отобраны в 10 случаях. У всех больных объем паренхимы был представлен достаточно и включал в себя корковый слой, юкстамедуллярную зону и частично медуллярный слой. Среди них 5 пациентов при светооптическом исследовании имели классические патоморфологические изменения в клубочках и ТИН [10], а в другой группе наличие аналогичных изменений сопровождалось лейкоцитарной активностью в перитубулярных капиллярах ТИН. При этом в обеих группах были типичные иммунофлюоресцентные признаки в виде отложения IgA, лямбда легких цепей, а также С3с-фракции комплемента в мезангиальных областях клубочков (см. рис. 1, Б, Г, Д). Наряду с этим в группе 1 наблюдались фокальные депозиты С3с-фракции комплемента (рис. 1, А) и фибриногена (рис. 1, В), локализовавшиеся в стенках перитубулярных микрососудов ТИН. Полуколичественная оценка

интенсивности и распространенности продукта реакции на С3с и фибриноген в группах подтвердила ранее выявленный при иммунофлюоресцентном анализе феномен (табл. 1).

Проведение иммуногистохимической реакции на С4d проводилось на дополнительно приготовленных парафиновых срезах в группе 1 и группе 2. Отложение продукта реакции на С4d отмечалось в микрососудах практически у всех больных преимущественно в группе 1. Продукт реакции располагался вдоль внутренней стенки перитубулярных капилляров ТИН (см. рис. 1, Е) в виде линейно расположенных масс, контурируя полностью или частично просвет микрососуда. Количество сосудов с позитивной реакцией в обеих группах было незначительно, однако в группе 1 их количество превышало 1% от общего числа подсчитанных в ТИН, в отличие от группы 2 (табл. 2). Кроме того, были обнаружены значимые, на наш взгляд, хотя и статистически недостоверные, ввиду небольшого количества случаев, различия между группами 1 и 2. Так, в группе 1 количество тотально склерозированных и фокально-склерозированных клубочков было больше. Выраженность мезангиальной пролиферации, ТИН склероза, СПБ и показатели креатинина сыворотки в группе, позитивной на С4d, также были выше, чем в другой группе. Такое же соотношение между группами отмечалось по признаку ПТК. В 1-й группе он существенным образом превышал значения 2-й группы (см. табл. 2). Четких различий по полу и возрасту в исследованных группах больных не наблюдалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании в некоторых случаях у больных с IgAN наблюдается позитивная реакция на С4d в стенке перитубулярных микрососудов. При этом наличие сосудов с С4d + - реакцией со-

Таблица 2

**Клинические и патоморфологические данные больных на момент
проведения почечной биопсии в 1-й и 2-й группах**

Клинические и патоморфологические данные	Группа 1 (С4d+)	Группа 2 (С4d-)
Возраст (муж.)	38,4±14,9	41± 7,1
Пол (М), %	40	60
Суточная потеря белка, г (М±m)	1,62±1,42	1,28± 1,04
Креатинин крови, ммоль/л (М±m)	0,131 ± 0,051	0,107± 0,055
СКФ мл/мин/1,73 м ² (М±m)	51,5±33,6	54,1±37,2
Количество позитивных капилляров ТИН на С4d (М±m)	1,36±0,34	0,46±0,23
Тотальный гломерулосклероз, %	23	12
Фокально-сегментарный гломерулосклероз, %	15	4
Умеренная и выраженная мезангиальная пролиферация (2–3), %	80	40
Умеренный и выраженный интерстициальный фиброз (2–3), %	80	40
Значимое количество ПТК, %	100	20

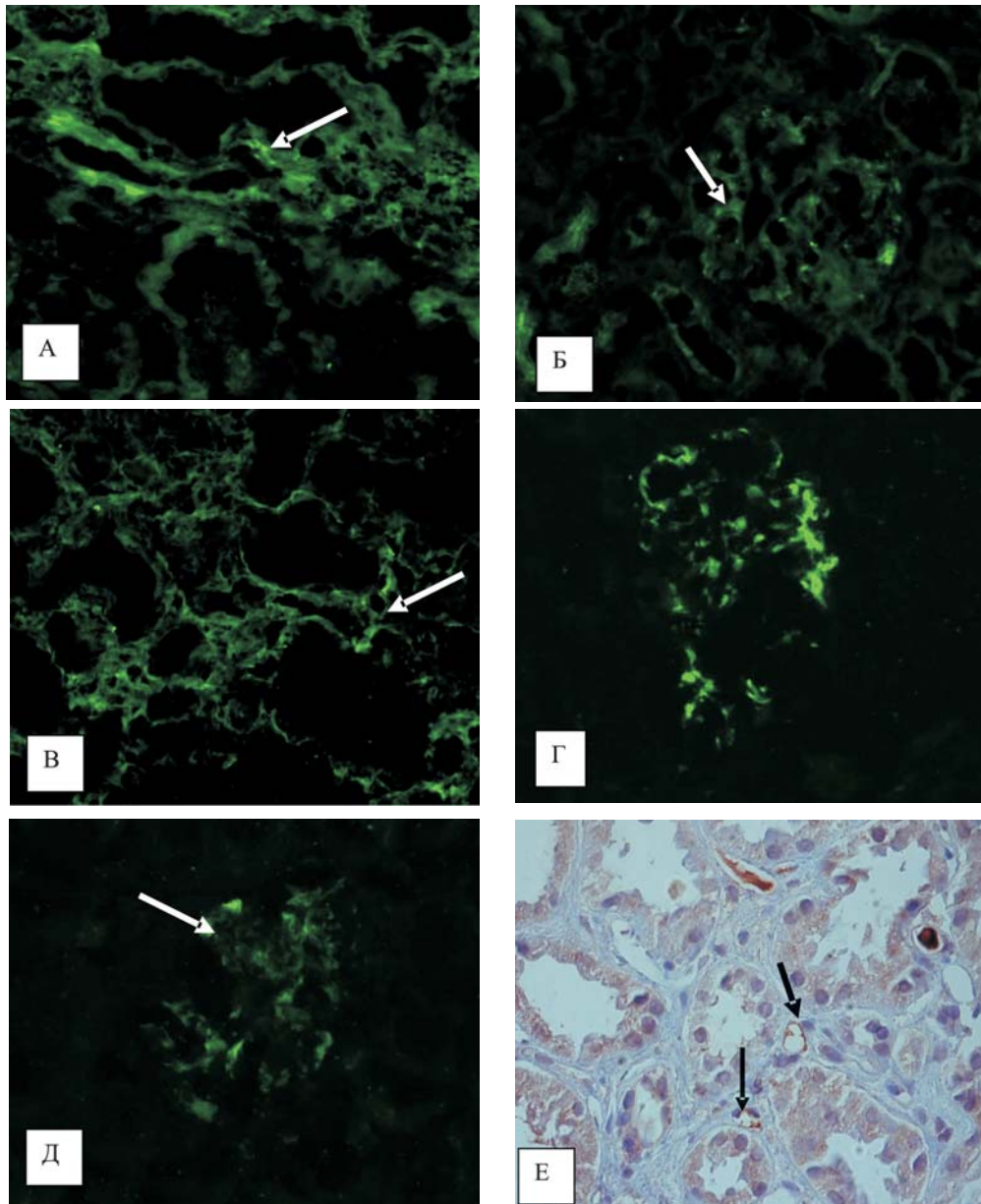


Рис. 1. Нефробиопсии больных с IgAN с репрезентативным отложением при иммунофлюоресцентном и ИГХ-исследовании (А) – С3с-фракции комплемента в микрососудах перитубулярного интерстиция и (Б) – С3с-фракции комплемента в мезангии клубочка – белые стрелки; (В) – фибриногена в микрососудах ТИН – белая стрелка; (Г) – IgA в мезангии гломерул (Д) – легких цепей лямбда в мезангии гломерул – белые стрелки; (Е) – С4d-фракции комплемента в микрососудах ТИН – черные стрелки. Исходное увеличение X40.

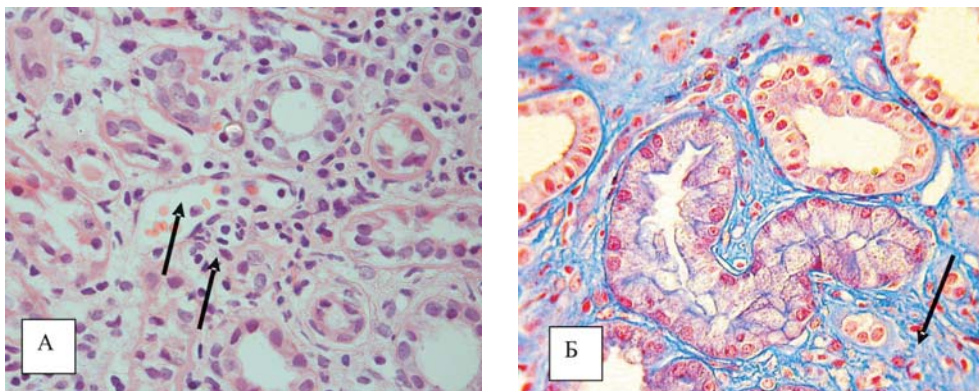


Рис. 2. Нефробиопсии больных с IgAN с репрезентативными патоморфологическими признаками. А – микрососудов ТИН, содержащих лейкоциты (черная стрелка). Б – склероза ТИН (черная стрелка). Окраска: А – гематоксилином и эозином; Б – по Массону. Исходное увеличение X40.

впадало с увеличением количества микрососудов с признаками воспалительной реакции – ПТК, гломерулосклерозом, склерозом тубулоинтерстиция, интерстициальной депозицией фибриногена и С3с-фракции комплемента. Полученные результаты частично согласуются с литературными данными по этому вопросу [7, 8].

Так за последние годы было установлено, что такие патогистологические признаки, как гломерулосклероз, интерстициальный фиброз, мезангиальная гиперклеточность, являются независимыми предикторами прогрессии почечной недостаточности у больных с IgA-нефропатией [9, 11]. Более того отложение C4d в структурах клубочка считается неблагоприятным прогностическим фактором развития IgAN. Одним из механизмов прогрессии данных патоморфологических процессов могут быть различные пути активации системы комплемента. Это связано с тем, что ключевым звеном в развитии IgAN является факт нарушения O-гликозилирования полимерной молекулы IgA1 [5, 10]. Депозиция измененного IgA в структурах почки может вести к воспалительным реакциям и активации систем комплемента. А по данным литературы вариант активации системы комплемента – альтернативный, классический, MBL (mannose-binding lectin)-лектиновый может во многом определять прогноз течения патологического процесса. В частности, лектиновый путь активации комплемента, инициированный MBL-комплексом, способствует повреждению клубочков и считается неблагоприятным предиктором течения IgAN [5, 12].

У наших пациентов с негативным окрашиванием в микрососудах ТИН на C4d – группа 2 активация комплемента осуществлялась, по-видимому, преимущественно по альтернативному пути. В другой же группе 1 с позитивной реакцией на C4d активация комплемента происходила частично через лектиновый или классический путь. Однако отсутствие в 100% случаев, по данным иммунофлюоресценции, в иммунных депозитах C1q свидетельствует скорее в пользу активации лектинового (MBL) пути. Эти данные любопытны, но не являются абсолютно новыми, поскольку подобные реакции мы наблюдаем у больных при антигеном варианте реакции отторжения трансплантата [13], которая также может сопровождаться развитием ПТК, наблюдавшегося и у наших больных в группе 1. Если же учесть при этом данные A. Roos и соавт. 2006 [6] о том, что интерстициальная лейкоцитарная инфильтрация при IgAN сочетается с более выраженной протеинурией и обусловлена MBL-

путем активации комплемента при связывании последнего с полимерными, а не мономерными молекулами IgA, то становится вполне очевидным факт активации лектинового пути комплемента у ряда больных с IgAN, сопровождающийся перитубулярным капилляритом и возможно (по данным гистологии) более неблагоприятным прогнозом. Существенным, на наш взгляд, можно считать тот факт, что в группе 1 при этом в ТИН отмечалась депозиция фибриногена, который, по данным S. Hisano и соавт. [14], маркирует кодепозицию при пурпуре Шенляйна–Геноха комплекса IgA1/IgA2 и соответствует более тяжелому течению протеинурии, гематурии и тяжести повреждении клубочков, что также вполне коррелирует с нашими результатами анализа отложения фибриногена в ТИН.

Таким образом, в настоящей работе мы смогли идентифицировать у части больных с IgAN факт активации лектинового пути комплемента в перитубулярных микрососудах, что сопровождается воспалительной реакцией в них, более тяжелым клиническим течением и, соответственно, менее благоприятным прогнозом.

К сожалению, настоящая работа имеет определенные ограничения в трактовке полученных данных, так как исследование было проведено только у 10 больных, и применение в данном случае полноценного статистического анализа было бы весьма спекулятивным. Это объясняется тем, что это исследование было предварительным, при котором получение наукоемких результатов было весьма проблематичным. Однако в связи с тем, что даже, несмотря на малое количество проанализированных данных, были получены перспективные на наш взгляд данные, мы планируем в дальнейшем расширить количество анализируемых случаев до статистически значимого уровня.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Naumovic R. Renal biopsy registry from a single centre in Serbia: 20 years of experience. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 877-885
2. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. *Semin Nephrol* 2004; 24: 179-196
3. Kobayashi Y, Tatenos S, Hiki Y et al. IgA nephropathy: prognostic significance of proteinuria and histological alterations. *Nephron* 1983; 34: 146-153
4. Van Den Dobbelaars MEA, Van Der Woude FJ, Schroeijers WEM et al. Binding of dimeric and polymeric IgA to rat renal mesangial cells enhances the release of interleukin 6. *Kidney Int* 1994; 46: 512-519
5. Espinosa M, Ortega R, Gomez-Carrasco MJ et al. Mesangial C4d deposition: a new prognostic factor in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 886-891
6. Roos A, Rastaldi MP, Calvares N et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is

associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1724-34

7. Arrizabalga P, Sole M, Quito I, et al. Leukocyte infiltration and intercellular adhesion molecule-1-mediated cell interactions in immunoglobulin A nephropathy. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 817-22

8. Chan LY, Leung JC, Lai KN. Novel mechanism of tubulointerstitial injury in IgA nephropathy: a new therapeutic paradigm in the prevention of progressive renal failure. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8: 297-303

9. Li PK, Ho KK, Szeto CC et al. Prognostic indicators of IgA nephropathy in the Chinese-clinical and pathological perspectives. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 64-69

10. D'Agati VD, Janne JCh, Silva FG. ATLAS Non-neoplastic kidney disease: IgA Nephropathy and Henoch-Schonlein Purpura. AFIP, Washington, ARP Press 2005; 297-323

11. Ibels LS, Gyory AZ. IgA nephropathy: analysis of the natural history important factors in the progression of renal disease and a review of the literature. *Medicine* 1994; 73: 79-102

12. Endo M, Ohi H, Oshawa I et al. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1984-1990

13. Solez K, Colvin RB, Racusen LC et al. BANFF 07 classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753-760

14. Hisano S, Matsushita M, Fujita T et al. Activation of the lectin complement pathway Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 295-302

Поступила в редакцию 07.06.2013 г.

Принята в печать 02.07.2013 г.