

ID: 2013-04-1276-A-2703

Оригинальная статья

Маслякова Г.Н., Напшева А.М.

**Морфология хронической болезни почек, обусловленной мочекаменной болезнью***ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского Минздрава России, НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии*

Maslyakova G.N., Napsheva A.M.

**Morphology of chronic kidney disease in urolithiasis***Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Urology***Резюме**

На основании анализа послеоперационного материала 154 больных мочекаменной болезнью проведена оценка морфологических изменений в разные стадии хронической болезни почек. Показано, что морфологические изменения при хронической болезни почек характеризуются стадийностью, имеют корреляционную связь с уровнем азотемии и скоростью клубочковой фильтрации. Разработана математическая модель, позволяющая определять стадию хронической болезни почек по данным морфометрического исследования.

**Ключевые слова:** хроническая болезнь почек, мочекаменная болезнь, морфология

**Abstract**

Based on the analysis of the biopsy material of 154 patients with urolithiasis, morphological changes in different stages of chronic kidney disease was evaluated. Morphological changes in chronic kidney disease are characterized by staging are correlated with the level of azotemia and glomerular filtration rate. A mathematical model that allows to determine the stage of chronic kidney disease according to the morphometric study was created.

**Key words:** chronic kidney disease, urolithiasis, morphology

**Введение**

Термин хроническая болезнь почек (ХБП) появился в 2002 году, когда официально был опубликован новый раздел Рекомендаций DOQI (Dialysis Outcome Quality Initiative), названный Рекомендациями по хроническим болезням почек [1]. У каждого десятого жителя Земли отмечаются признаки ХБП [2]. На ранних стадиях болезнь диагностируется лишь у 1% населения. Согласно результатам крупного исследования NEORICA, проводимом в Великобритании, среди 40 097 200 обследованных жителей страны в возрасте старше 18 лет ХБП 3-5-й стадий выявлена у 3 547 654 человек, что составляет 8,8%. Ежегодный прирост диализной ХПН (5-я стадия ХБП) составляет 100-150 человек на 1 млн. населения. По мнению ряда исследователей, наблюдающийся в настоящее время прогрессивный рост числа пациентов с терминальной ХПН приобретает характер пандемии [4].

Анализ данных литературы показал, что большинство работ посвящено изучению ХБП при таких заболеваниях, как гломерулонефрит, сахарный диабет, гипертоническая болезнь, атеросклероз и т.д., что даже обозначено в литературе термином «кардиоренальный континуум». При этом работ, посвященных изучению ХБП при МКБ, практически нет, тогда как МКБ в настоящее время является одним из самых распространенных урологических заболеваний и составляет в развитых странах от 0,5 до 5,3 %. В России на долю МКБ приходится до 38,2% всех урологических больных, наиболее часто данная патология поражает людей в самый активный период их жизни – 20-50 лет, что, несомненно, представляет огромную экономическую проблему современного здравоохранения. В настоящее время ХБП изучается с позиций клинико-лабораторной диагностики, тогда как морфологические работы практически отсутствуют.

**Цель исследования:** оптимизация морфологической диагностики ХБП, обусловленной МКБ, в различные стадии ее развития, и установление критериев раннего повреждения паренхимы и стромы почек на доклиническом этапе.

**Материал и методы**

Материалом для исследования послужил послеоперационный материал, полученный от 154 больных, находившихся на стационарном лечении по поводу мочекаменной болезни в период с 2005 по 2010 годы в ГКБ № 3 им. С.П. Миротворцева ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

Средний возраст больных составил 47,1 года. Количество мужчин – 63 (40,1%), женщин – 91 (59,9%).

Диагноз МКБ устанавливали на основании данных анамнеза, субъективных и объективных клинических признаков, результатов УЗИ, других инструментальных и лабораторных методов исследований.

Стадию ХБП определяли по уровню скорости клубочковой фильтрации (СКФ) согласно последним рекомендациям NKF-K/DOQI (2005). СКФ подсчитывали с использованием формулы Кокрофта-Голта, в которой учитывается уровень креатинина сыворотки крови, возраст и масса тела пациента.

По результатам подсчета СКФ согласно последним рекомендациям NKF-K/DOQI (2005) все пациенты были разделены на 5 групп. В качестве контроля использовали секционный материал, полученный во время проведения судебно-медицинской экспертизы 30 лиц, умерших от заболеваний, не связанных с патологией почек. Возраст группы контроля составил 31-52 года (Me=44,0).

Послеоперационный или биопсийный материал для гистологического исследования фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, обезжировали в ацетон-ксилоловой батарее и заливали в парафин. После депарафинизации срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином для обзорного гистологического изучения. Для оценки степени разрастания

соединительной ткани – пикрофуксиновой смесью по методу Ван-Гизон и трихромом по Массону, для выявления признаков дезорганизации соединительной ткани использовали гистохимический метод ОКГ (оранжевый Ж, кислотный красный, водный голубой).

При проведении стандартного гистологического исследования оценивали клубочковый аппарат и состояние тубулоинтерстициальной зоны с использованием определенного алгоритма изучения нефробиоптата. Для определения размеров объектов использовали окуляр-микрометр, сетку Автандилова (Автандилов Г.Г., 1994), а также морфометрическую систему Bio Vision и автоматизированную систему подсчета морфологических изменений ARIOL (США). Морфометрическое исследование выполняли в 30 полях зрения.

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных мышиных антител к сосудисто-эндотелиальному фактору роста, рецепторам EGFR, к семейству цитокератинов: 8, 5/6, 34 $\beta$ E, 10/13. Пролиферативную активность эпителиоцитов канальцев почек изучали иммуногистохимическим методом с применением моноклональных мышиных антител к Ki-67, а также с помощью выявления антигена ядра пролиферирующей клетки PCNA. Теорию эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток эпителия канальцев почек проверяли с использованием Е-кадгерина.

Для обработки данных был использован пакет прикладных статистических программ BioStat 5.8.4.3 версия 2009 (AnalystSoft® Inc.) и STATISTICA 10.0 (StatSoft® Inc.). Предварительная статистическая обработка данных заключалась в проверке соответствия формы распределения количественных признаков нормальному, для чего использовали критерий Шапиро-Уилка, а также равенства генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. Проверку гипотезы о равенстве генеральных средних во всех случаях проводили с помощью H-критерия Краскела-Уоллиса для оценки различий нескольких независимых групп. Нулевую гипотезу отвергали в случае  $p < 0,05$ . Парное межгрупповое сравнение проводили с использованием Q-критерия Данна. Исследование взаимосвязи между количественными признаками осуществляли при помощи парного коэффициента линейной корреляции Спирмена. Значимость морфометрических показателей выявляли с помощью дискриминантного анализа с измерением уровня лямбды Уилкса. Для каждого показателя в исследуемых группах вычисляли такие значения, как медиана (Me), мода (Mo), минимум и максимум значений, межквартильный размах.

## Результаты

Сопоставление клинико-лабораторных и морфометрических показателей почек при различных стадиях ХБП позволило обозначить ряд новых закономерностей прогрессирования ХБП (табл.1).

Так к морфологическим признакам ранних стадий ХБП можно отнести: выраженное утолщение стенки артерий, уменьшение диаметра проксимальных и дистальных извитых канальцев, появление очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрации, а также разрастание в интерстициальной зоне нежно-волокнистой соединительной ткани. Подобные изменения были обнаружены нами при исследовании биоптатов пациентов с 1 и 2 стадией ХБП.

Что же касается более поздних стадий ХБП, то они, к сожалению, имеют менее важное значение в прогностическом плане, однако именно морфологические проявления, развивающиеся на поздних стадиях, наиболее ярко демонстрируют ведущую роль изменений тубулоинтерстициальной зоны в механизме развития ХБП. Так, если размер клубочков в 5-й стадии по сравнению с 1-й уменьшался в среднем в 2,7-3,1 раза, то диаметр канальцев – в 5 раз. Следует отметить, что статистически значимое уменьшение размеров клубочков стали регистрировать лишь с 3-й стадии, когда в почке стали развиваться необратимые процессы.

Таблица 1. Сравнительная характеристика морфометрических показателей больных с разными стадиями ХБП

|                                                    | Группа контроля | 1-я группа | 2-я группа | 3-я группа | 4-я группа | 5-я группа |
|----------------------------------------------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Количество больных в группе                        | 30              | 32         | 47         | 36         | 26         | 13         |
| Пол больных                                        | Муж.            | 19         | 5          | 17         | 14         | 8          |
|                                                    | Жен.            | 11         | 27         | 30         | 12         | 5          |
| Средний возраст, Ме                                | 38,4            | 48         | 46         | 48         | 45,5       | 48         |
| Длительность заболевания, лет, Ме                  | -               | 6          | 5          | 9          | 10,5       | 10         |
| Креатинин сыворотки крови, Ме                      | -               | 76,9       | 104        | 137        | 206        | 481        |
| Мочевина сыворотки крови, Ме                       | -               | 4,9        | 5,9        | 8,9        | 10,9       | 17,3       |
| СКФ, Ме                                            | -               | 98         | 71         | 43,5       | 26,5       | 11         |
| Размеры почек по данным УЗИ, Ме                    | -               | 11,5       | 11,5       | 11,7       | 11,55      | 9,4        |
| Расширение ЧЛС почек, %                            | -               | 21,8       | 68,08      | 83,3       | 92         | 100        |
| Количество склерозированных клубочков, %           | 0               | 5,1*       | 18,5*      | 50*        | 85*        | 91*        |
| Размер длинной оси клубочка, мкм, Ме               | 320             | 356        | 344        | 280*       | 180*       | 120*       |
| Размер короткой оси клубочка, мкм, Ме              | 300             | 332        | 300        | 200*       | 150*       | 96*        |
| Диаметр проксим. канальцев, мкм, Ме                | 112             | 77,5*      | 75,5*      | 58,5*      | 56*        | 21*        |
| Диаметр дистальных канальцев, мкм, Ме              | 75              | 68*        | 56*        | 54*        | 34*        | 15*        |
| Высота эпителиоцита, мкм, Ме                       | 26              | 24         | 36*        | 13,5*      | 6*         | 4*         |
| Толщина стенки артерий, мкм, Ме                    | 33,5            | 56*        | 142*       | 112*       | 147*       | 166*       |
| Количество клеток в инфильтрате коркового в-ва, Ме | 15              | 25         | 100*       | 350*       | 500*       | 750*       |
| Количество клеток в инфильтрате мозгового в-ва, Ме | 7               | 25*        | 100*       | 275*       | 425*       | 500*       |

Примечание : \*  $p < 0,05$ .

Во 2-ю стадию ХБП в канальцах почек развиваются компенсаторно-приспособительные процессы в виде выраженного увеличения размеров эпителиоцитов в 1,5 раза и пролиферации эпителия канальцев.

Факт пролиферативной активности эпителиоцитов подтвержден нами и при проведении иммуногистохимического исследования с антигеном пролиферирующего клеточного ядра (PCNA), который является мультифункциональным белком и экспрессируется в делящихся клетках. Площадь экспрессии в биопсийном материале почки пациентов 2-й группы достигала 84%, в то время как в 1-й группе данный показатель соответствовал 7,8%, в 3-й группе – 7%, в 4-й – 3,5%.

Одной из теорий, объясняющих развитие тубулоинтерстициальных изменений, является теория эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) клеток. Считается, что эпителиоциты теряют свою эпителиальную дифференцировку и начинают экспрессировать мезенхимальные факторы, которые способствуют развитию склеротических изменений. В нашем исследовании мы попытались определить наличие факта эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток по результатам определения уровня экспрессии Е-кадгерина, так как согласно данным ряда авторов именно потеря Е-кадгерина свидетельствует о начале процесса ЭМТ [5,6].

Проведено иммуногистохимическое исследование с набором цитокератинов (34βЕ, 10/13, 5/6 и 8), выявляющих эпителиальные клетки, а также Е-кадгерина. Согласно теории ЭМТ, мы должны были получить максимальный уровень экспрессии на первых двух стадиях и минимальный – в последних стадиях ХБП, чего не было в нашем исследовании. Во всех группах наблюдения отмечена ярко выраженная реакция, по результатам подсчета histochemical score соответствующая положительной реакции и определенная нами как +++ . При дальнейшем проведении иммуногистохимического исследования мы получили достоверные данные, подтверждающие, что при прогрессировании ХБП в эпителиоцитах канальцев почек снижается экспрессия Е-кадгерина. Согласно результатам данного исследования, снижение экспрессии происходит постепенно от 2-й стадии до отрицательных результатов в 4-й и 5-й стадиях ХБП, что подтверждено получением статистически значимого уровня  $p=0,021$ . При этом снижение экспрессии антигена происходило именно в эпителиоцитах, уменьшенных в размерах, приобретающих вытянутую, веретенообразную форму уже со 2-й стадии ХБП, что свидетельствовало об исчезновении в них фенотипических признаков эпителиальной ткани. Мы считаем это морфологическим проявлением нарушения нормальной последовательности развития репаративных процессов: пролиферация – дифференцировка. И если во второй стадии мы регистрировали признаки компенсаторно-приспособительных процессов, то начиная с третьей стадии, морфологические изменения свидетельствовали о нарушении процесса дифференцировки клеток (что подтверждало исчезновение Е-кадгерина), и начиналось развитие склеротических процессов, что можно считать началом необратимости хронической болезни почек.

Таким образом, полученные в результате исследования данные подтвердили стадийность изменений не только клинко-лабораторных показателей, но и морфологической картины в различные стадии ХБП; позволили выявить морфологические критерии каждой из стадий ХБП, в том числе и на первых стадиях развития заболевания, а также установить возможность развития компенсаторно-приспособительных процессов в почке во вторую стадию с последующим формированием необратимого нефросклероза.

Проведенное исследование выявило наличие корреляционной связи разного направления и силы между клинко-лабораторными и морфометрическими показателями как тубуло-интерстициальных компонентов, так и клубочков. Следует отметить, что, снижение СКФ происходит задолго до появления морфологических признаков повреждения клубочков. Это подтверждается тем фактом, что статистически значимые различия в морфометрических показателях изменения клубочкового аппарата по сравнению с группой контроля появляются только в 3-й стадии ХБП. При проведении корреляционного анализа установлено, что наиболее выраженную корреляционную связь как с уровнем креатинина и мочевины сыворотки крови, так и со СКФ, а соответственно и со стадией ХБП имеют такие показатели, как размеры длинной и короткой осей клубочка, количество клеток в инфильтратах мозгового и коркового вещества. Умеренную корреляционную связь показали такие параметры, как количество склерозированных клубочков, диаметр извитых канальцев, высота эпителиоцита, а также толщина стенки артерий. В зависимости от стадии ХБП сила и направление корреляционных связей меняется. Наиболее ранними морфометрическими показателями, уже на ранних стадиях реагирующими на изменения уровня креатинина сыворотки крови, являются толщина стенки артерий и количество клеток в лимфо-гистиоцитарных инфильтратах коркового и мозгового вещества. Кроме того, стоит отметить, что по результатам корреляционного анализа до 5-й стадии ХБП диаметр проксимальных канальцев не имеет зависимости от уровня азотемии и СКФ, в отличие от диаметра дистальных канальцев, показывающих умеренную зависимость уже на 2-й стадии ХБП.

Проведя пошаговый дискриминантный анализ со всеми возможными вариантами, была создана оптимальную модель для определения стадии ХБП с использованием морфометрических показателей. Для этого в группу анализируемых признаков были включены все изученные параметры, имеющие значимую корреляционную связь со скоростью клубочковой фильтрации во всех исследуемых группах. Таким образом, в модель для определения скорости клубочковой фильтрации вошли такие параметры, как средний размер длинной и короткой осей клубочка, минимальная высота эпителиоцита, минимальная толщина стенки артерий, максимальное количество клеток в инфильтратах коркового вещества и минимальное количество клеток в инфильтратах мозгового вещества.

$$Y = 0,089X_1 + 0,1085X_2 + 1,036X_3 + 0,07X_4 + 0,049X_5 + 0,0298X_6 - 46,86,$$

где  $Y$  – значение скорости клубочковой фильтрации,  $X_1$  – средний размер длинной оси клубочка,  $X_2$  – средний размер короткой оси клубочка,  $X_3$  – минимальная высота эпителиоцита,  $X_4$  – минимальная толщина стенки артерий,  $X_5$  – максимальное количество клеток в инфильтрате коркового вещества,  $X_6$  – минимальное количество клеток в инфильтрате мозгового вещества.

По вычисленной формуле на всем базовом материале по каждому случаю было подсчитано значение скорости клубочковой фильтрации и проведено сравнение с показателями клинко-лабораторного обследования больного. Расхождения между полученными результатами были выявлены только в 5-й группе наблюдения, что связано, на наш взгляд, с рубцовым сморщиванием почек. Во всех остальных группах сопоставление полученных данных с истинным значением скорости клубочковой фильтрации, рассчитанной с использованием формулы Кокрофта-Голта, отмечается на уровне среднего значения скорости клубочковой фильтрации, что, по нашему мнению, является достаточным для определения стадии ХБП по морфологическим критериям.

### Обсуждение

Стоит отметить, что в работах многих исследователей морфологическая картина ХБП описывается с учетом классификации, основанной на степени тубулоинтерстициальных изменений, предложенной В.В. Ставской и С.И.Рябовым (1987), и подразделяющую степень изменений тубулоинтерстициальной зоны на незначительные, умеренные и выраженные, составляющие до 30%, от 30 до 70% и более 70% повреждения тубуло-интерстициального аппарата почки соответственно [3]. В данном исследовании мы также сделали попытку использования данной классификации и пытались разделить группы наблюдения не по результатам клинко-лабораторного исследования, а по степени тубулоинтерстициальных изменений. В дальнейшем при сопоставлении степени изменений тубулоинтерстициальной зоны с данными клинко-лабораторного исследования, мы получили, что 1 группу составили пациенты с 1 стадией ХБП, во 2 группу вошли как пациенты со 2 стадией, так и с 3 стадией ХБП, а в 3 группу вошли пациенты с 3,4 и 5 стадиями ХБП. Таким образом, согласно данной классификации в группу умеренных изменений могут входить одновременно пациенты и с ранней стадией заболевания и с уже доказанной по результатам клинко-лабораторного исследования хронической почечной недостаточностью. А в группу выраженных изменений могут входить пациенты с 3 стадией ХБП и уже с 5 терминальной диализной стадией хронической почечной недостаточности.

Данное обстоятельство послужило поводом отказаться от предложенной классификации, так как подобное разделение не позволяет сопоставить морфологическую картину с клинко-лабораторными показателями при изучении различных стадий ХБП, выявить ранние морфологические изменения, характерные для 1-й стадии развития ХБП, и кроме того мы считаем, что не совсем корректно сравнивать площади поражения в биопсийном материале, представленном столбиком ткани площадью не более квадратного сантиметра и площадью ткани соответствующей удаленной почке.

### Заключение

Таким образом, морфологическое и морфометрическое исследования почек показали, что структурные изменения в почке имеют стадийный характер развития и количественные показатели, соответствующие определенной стадии развития ХБП. Выявлена ярко выраженная корреляционная связь различной силы и направления со скоростью клубочковой фильтрации и, соответственно, со стадией ХБП и определенными морфометрическими показателями. Установлено, что морфологическими признаками повреждения почек на ранних стадиях ХБП являются: снижение диаметра как дистальных, так и проксимальных извитых канальцев, выраженное утолщение стенки артерий уже на первой стадии ХБП, появление очаговых лимфогистиоцитарных инфильтратов. Вторая стадия ХБП характеризуется развитием компенсаторно-приспособительных процессов в виде гипертрофии эпителиоцитов и пролиферации канальцевого эпителия, подтвержденной как при обычной окраске, так и при иммуногистохимическом окрашивании. Предложенная математическая модель, основанная на морфометрических показателях, может быть использована для диагностики ранних стадий ХБП.

### Литература

1. Земченков А.Ю., Томила Н.А. К/ДОКИ обращается к истокам хронической почечной недостаточности (о новом разделе Рекомендаций К/ДОКИ по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек) // Нефрология и диализ. – 2004. – Т.6, №3. – С.204-220.
2. Современные принципы диагностики и лечения хронической болезни почек: Методическое руководство для врачей/ Под ред. Е.М.Шиловой. – Саратов., 2011. – 60 с.
3. Ставская В.В., Рябов С.И., Клемина И.К. О клиническом значении тубулоинтерстициальных изменений при хроническом гломерулонефрите // Клин. мед. – 1987. – №10. – С.125-129.
4. Locatelli F., Pozzoni P., Del Vecchio L. Epidemiology of chronic kidney disease in Italy: possible therapeutical approaches // J. Nephrol. – 2003. – N16. – P.1-10.
5. Strutz F., Okada H., Neilson E.G. The role of the tubular epithelial cell in renal fibrogenesis// Clin. Exp. Nephrol. – 2001. – Vol. 5. – P. 62 – 74.
6. Doble B. W., Woodgett J. R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions // Cells Tissues Organs. – 2007. – V. 185. – P. 73-84.