

# ПРИМЕНЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ НЕФРОБИОПТАТА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОТВЕТА НА ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДНУЮ ТЕРАПИЮ У ДЕТЕЙ С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

<sup>1</sup>И.В.САХАРОВ, <sup>1</sup>Е.Д.ЧЕРСТВЫЙ, <sup>1</sup>А.В.СУКАЛО, <sup>1</sup>Т.А.ЛЕТКОВСКАЯ, <sup>2</sup>Н.И.ТУР

<sup>1</sup> Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

<sup>2</sup> УЗ «2-я городская детская клиническая больница», г. Минск

*Поиск предикторов развития стероид-резистентности при нефротическом синдроме считается одной из самых актуальных проблем детской нефрологии. В настоящем исследовании изучена роль иммуногистохимических маркеров для прогнозирования стероид-резистентности. В исследование были включены 65 детей с нефротическим синдромом, прошедшие нефробиопсию. В гистологических срезах оценивали экспрессию нефрина и подокаликсина, а также плотность подоцитов в срезе клубочка. Полученные показатели использовали для построения регрессионной модели выживаемости. При статистическом анализе обнаружен показатель, ассоциированный с развитием стероид-резистентности, – плотность подоцитов. Анализ выживаемости показал, что стероид-резистентность развивается раньше и чаще у больных с низкой плотностью подоцитов в клубочках. Значимыми для прогнозирования стероид-резистентности оказались гистологические изменения в клубочках (фокально-сегментарный гломерулосклероз), а также пол пациентов.*

## Введение

Возможность прогнозирования резистентности к терапии глюкокортикоидами (ГКС) при нефротическом синдроме (НС) имеет важное клиническое значение. Стероид-резистентность при НС считается одним из факторов риска наступления хронической почечной недостаточности (ХПН). Терминальная стадия ХПН развивается более чем у 40% пациентов в течение пяти лет после установления диагноза стероид-резистентного НС [1]. При стероид-резистентности также высок риск невосприимчивости к другим методам иммуносупрессивной терапии [2].

В настоящее время нет надёжных клинических или морфологических диагностических признаков, которые могли бы быть предикторами развития стероид-резистентности у детей с НС [3]. Исследование нефробиоптата даёт возможность не только выявить гистологические изменения в ткани почки, но и установить нарушения экспрессии биологических молекул, что может быть использовано для прогнозирования течения заболевания.

Целью настоящего исследования явился анализ возможности применения иммуногистохимических маркеров для прогнозирования ответа на глюкокортикоидную терапию НС у детей.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на архивном материале пункционных нефробиопсий, проведённых в УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска в 2005 – 2010 годах. Для гистологического и имму-

ногистохимического исследования были отобраны 65 биоптатов.

Для иммуногистохимического исследования срезы нефробиоптатов окрашивали с использованием антител к человеческому подокаликсину и белку WT1. Для морфометрического анализа при помощи микроскопа с цифровой камерой фотографировали пять случайно выбранных клубочков биоптата при увеличении 400.

Оценку экспрессии нефрина и подокаликсина проводили с использованием программы анализа изображений Aperio Image Score, которая определяла распространённость и интенсивность окрашивания в клубочках. Распространённость окрашивания характеризовалась показателем экспрессии (ПЭ), который рассчитывался программой как отношение числа позитивных пикселей к площади капиллярного тельца. Также на основании анализа всего изображения клубочка программой вычислялся показатель интенсивности (ПИ) окрашивания, который выражался в условных единицах от 255 (минимальная интенсивность) до 0 (максимальная интенсивность).

Оценка изменения числа подоцитов в клубочках была выполнена с помощью программы WCIF ImageJ. Экспрессию белка WT1 использовали для идентификации подоцитов. Плотности подоцитов в клубочках рассчитывали по формуле:  $ПП = (\text{число WT1-позитивных ядер } Ч \cdot 10000 \text{ мкм}^2) / \text{площадь клубочка}$ .

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica

6.0 (StatSoft Inc.) и MedCalc 11.6.0.0 (MedCalc Software). Для оценки клинического значения полученных данных была построена регрессионная модель выживаемости (регрессионная модель для цензурированных данных). За уровень статистической значимости принимался  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Больные НС были разделены на 3 группы в зависимости от ответа на терапию ГКС (чувствительность, резистентность, зависимость). Наличие резистентности определялось в случае отсутствия эффекта от назначения ГКС в дозе 2 мг/кг/сут (60 мг/м<sup>2</sup>) в течение 8 недель. Зависимость от ГКС определялась в случае возникновения рецидива протеинурии при снижении дозы ГКС или при переходе на альтернирующий приём препаратов. В остальных случаях НС считался стероид-чувствительным.

При гистологическом исследовании у 46 пациентов были выявлены минимальные изменения клубочков (МИ), у 13 пациентов наблюдался фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), у 6 – мезангиальная пролиферация (МзП). У пациентов со стероид-резистентностью при гистологическом исследовании чаще выявлялся ФСГС ( $\chi^2 = 14,46$ ,  $p = 0,006$ ).

Чувствительность и зависимость от ГКС терапии чаще наблюдались у мальчиков (М:Д = 25:14 и М:Д = 7:3 соответственно), а резистентность несколько чаще у девочек (М:Д = 6:7), но без статистически значимых различий. При стероид-резистентном НС возраст на момент биопсии и возраст дебюта заболевания были больше, а длительность до проведения биопсии меньше, чем при чувствительности или зависимости от ГКС.

Для удобства проведения анализа пациенты с чувствительностью и зависимостью от ГКС были объединены в одну группу (стероид-чувствительные), которую сравнивали с группой стероид-резистентных пациентов.

Для оценки клинического значения иммуногистохимических маркеров и рассчитанных морфометрических показателей была построена регрессионная модель выживаемости (регрессионная модель для цензурированных данных). Зависимым (прогнозируемым) признаком в модели был выбран ответ на ГКС терапию, прогнозируемым значением признака – резистентность к ГКС терапии. В качестве изучаемых признаков (прогностических факторов) учитывались показатели экспрессии (ПЭ) и интенсивности (ПИ) нефрина и подокаликсина и плотность подоцитов как характеризующие изменения эпителиальных клеток клубочка. Для всей модели в целом было получено значение  $\chi^2 = 15,64$  и  $p = 0,008$ .

Из всех анализируемых показателей только для плотности подоцитов уровень статистической значи-

мости оказался меньше принятого. Следовательно, только плотность подоцитов ассоциирована со временем до наступления резистентности к ГКС терапии, и этот показатель может быть применён для прогнозирования наступления стероид-резистентности.

Для оценки точности диагностического метода были рассчитаны его операционные характеристики (диагностические чувствительность и специфичность) и построена ROC-кривая для всей группы больных НС.

Наиболее удалённой от нулевой прямой оказалась точка на ROC-кривой, в которой диагностическая чувствительность была равна 83,8%, специфичность 71,1%, плотность подоцитов 21,65 клеток на 10000 мкм<sup>2</sup>. Это значение показателя было принято в качестве точки отсечения (cut-off point), которая разделила выборку на случаи с высокой и низкой плотностью подоцитов.

Для выяснения влияния плотности подоцитов на время до наступления стероид-резистентности был проведён анализ выживаемости по методу Каплана-Майера с сопоставлением групп больных – тест Гехана-Уилкоксона.

Для теста было получено значение  $p = 0,008$ , т. е. были обнаружены статистически значимые различия между группами пациентов с высокой и низкой плотностью подоцитов по времени до наступления стероид-резистентности. Стероид-резистентность у пациентов с низкой плотностью подоцитов чаще всего развивалась в дебюте заболевания и наступала чаще, чем у пациентов с высокой плотностью подоцитов.

Также анализ выживаемости был проведён для оценки влияния гистологических изменений в клубочках на время до наступления стероид-резистентности. Были сравнены группы пациентов с МИ, МзП и ФСГС. Для теста было получено значение  $p = 0,003$ , что указывает на статистически значимые различия по наступлению стероид-резистентности у пациентов с разными гистологическими изменениями. Для тубуло-интерстициальных изменений статистически значимых различий по времени до наступления стероид-резистентности получено не было.

Из остальных анализируемых признаков значимым для прогнозирования наступления стероид-резистентности оказался пол пациентов. При сравнении выживаемости в зависимости от пола было установлено, что резистентность значимо раньше наступает у девочек ( $p = 0,011$ ).

На основании проведённого анализа наиболее вероятным наступление стероид-резистентности при НС следует предполагать у лиц женского пола с гистологическим изменениями в виде ФСГС и плотностью подоцитов в клубочках менее 21,65 клеток на 10000 мкм<sup>2</sup>.

Показатели экспрессии и интенсивности окрашивания нефрина и подокаликсина не имели значимых различий, что не даёт возможности использовать их для прогнозирования ответа на терапию ГКС. Эти закономерности указывают на то, что ответ на ГКС связан не столько с изменениями отдельных белков подоцитов, сколько с количественными изменениями клеток клубочка.

Отсутствие связи экспрессии нефрина и подокаликсина со стероид-резистентностью не означает невозможность применения антител к этим белкам для диагностики других клинических аспектов нефротического синдрома. Ранее нами показано снижение их экспрессии у пациентов с НС по сравнению с пациентами с изолированной гематурией, а также связь их экспрессии с уровнем протеинурии. Вероятно, дальнейшее изучение этих закономерностей даст возможность прогнозировать тяжесть течения не только НС, но и других гломерулопатий.

#### **Выводы:**

1. Резистентность к терапии ГКС у пациентов с НС имеет связь с количеством подоцитов в клубочках.

2. Значимыми признаками для прогнозирования стероид-резистентности являются плотность подоцитов в клубочках, гистологические изменения в клубочках почки и пол пациентов.

#### **Литература**

1. McBryde K., Kershaw D. // Current Problems of Pediatrics. – 2001. – No.31. – P.275–307.
2. Ehrich J.H.H. [et al.] // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2007. – Vol.22. – No.8. – P.2183–2193.

3. Hoyer P.F., Vester U., Becker J.U. // Comprehensive Pediatric Nephrology. – Elsevier, 2008. – Ch.16. – P.257–267.

#### **USE OF MORPHOMETRIC METHODS FOR EVALUATING NEPHROBIOPSY MATERIAL AIMED AT PREDICTION OF RESPONSE TO GLUCOCORTICOSTEROID THERAPY IN CHILDREN WITH NEPHROTIC SYNDROME**

**I.V.Sakharov, E.D.Cherstvy, A.V.Sukalo, T.A.Letkovskaya, N.I.Tur**

Searching for predictors of steroid-resistant nephrotic syndrome is one of the most pressing issues of pediatric nephrology. The role of immunohistochemical markers in prediction of steroid resistance was investigated in this study. Kidney biopsy specimens were obtained from 65 children with nephrotic syndrome. Fine sections were stained with antibodies to the human nephrin, podocalyxin and WT1 protein. Using the software, the morphometric analysis of images was performed and indices, characterizing the expression of markers and the density of glomerular podocytes in the section, were calculated. Indices for regression model of survival were used. The podocytes density appeared to be associated with the development of steroid-resistance. We calculated the value of podocytes density (21.65 cells per 10,000 sq mkm) that divided the sample into cases with high and low density of podocytes. The survival analysis showed that steroid resistance developed earlier and more frequently in patients with a low podocytes density in the glomeruli. Histological changes in the glomeruli (focal segmental glomerulosclerosis), and as well as sex of patients were of predicting value for steroid resistance.

## **НОРМАТИВНО-ПРАВОВАЯ БАЗА, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩАЯ ОХРАНУ ЗДОРОВЬЯ ГРАЖДАН В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ**

**М.М.САЧЕК, И.В.МАЛАХОВА, Т.В.ДУДИНА,  
А.И.ЕЛКИНА, Н.А.ГУТИЧ**

Республиканский научно-практический центр медицинских технологий, информатизации, управления и экономики здравоохранения, г. Минск

*Проведен анализ нормативно-правовой базы здравоохранения Республики Беларусь (НПБЗ), свидетельствующий, что в республике создана правовая основа для реализации конституционного права граждан на охрану здоровья и получения квалифицированной медицинской помощи надлежащего качества. Дана количественно-тематическая характеристика НПБЗ в целом и НПБ, регулирующей вопросы охраны здоровья граждан, выявлены основные ее недостатки, направления развития и совершенствования.*

Международный опыт свидетельствует, что успешное решение всех стратегических задач совершенствования системы здравоохранения требует плано-

мерного перевода отрасли на правовые основы. В современном международном праве наблюдается комплексный подход к обеспечению полноценной жиз-