

Mgr Joanna Bulak

**„Analiza morfometryczna nasilenia włóknienia
śródmiażdżowego w różnych typach kłębuszkowych
zapaleń nerek”**

Rozprawa doktorska

Zakład Patomorfologii Klinicznej
Katedra Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Promotor

Dr hab. Prof. UM Aldona Woźniak

Poznań 2013

Serdeczne podziękowania składam:

Pani Promotor Dr hab. Profesor UM Aldonie Woźniak

*Z Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Za koordynowanie badań, opiekę i pomoc w realizacji niniejszej rozprawy.*

*Panu Profesorowi dr hab. Przemysławowi Majewskiemu, Kierownikowi Katedry i
Zakładu Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Za umożliwienie napisania pracy w Katedrze Patomorfologii Klinicznej.*

*Pani Profesor dr hab. Elżbiecie Kaczmarek, Kierownikowi Zakładu Bioinformatyki i
Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego
w Poznaniu wraz z Zespołem
Za udostępnienie programów do morfometrycznej analizy obrazu i przeprowadzenie
analizy statystycznej*

*Pani Profesor dr hab. Wiesławie Salwie-Żurawskiej
Z Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Za nieocenioną pomoc i wsparcie.*

Rodzicom

Za ogromne emocjonalne i organizacyjne wsparcie.

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
WSTĘP	7
1. Budowa śródmiaższu kory i rdzenia nerki	7
2. Śródmiaższ nerki w warunkach patologicznych	7
3. Rola miofibroblastów we włóknieniu śródmiaższu	13
4. Barwienia histologiczne obrazujące włóknienie śródmiaższu nerki	18
5. Metody jakościowe, półilościowe i ilościowe stosowane w ocenie obrazów morfologicznych	19
6. Analiza cyfrowych obrazów medycznych	22
7. Ilościowa analiza obrazów biomedycznych	23
7.1. Metody półautomatyczne i automatyczne	23
7.2. Etapy komputerowej analizy obrazów Mikroskopowych	25
CELE PRACY	28
MATERIAŁ I METODY	29
1. Badania świetlno-mikroskopowe, ultrastrukturalne i immunofluorescencyjne	30
2. Badania morfometryczne	35
2.1. Tworzenie i rejestracja cyfrowych obrazów mikroskopowych	35
2.2. Analiza morfometryczna półautomatyczna nasilenia włóknienia śródmiaższowego	
2.3. Analiza morfometryczna automatyczna nasilenia włóknienia śródmiaższowego	36

3.	Obserwacje kliniczne	39
4.	Analiza statystyczna wyników pomiarów morfometrycznych i obserwacji klinicznych	40

WYNIKI

1.	Wyniki badań morfologicznych	41
2.	Wyniki badania immunofluorescencyjnego	45
3.	Badania morfometryczne świetlno-mikroskopowe	47
4.	Obserwacje kliniczne	56

OMÓWIENIE	79
------------------	-----------

WNIOSKI	91
----------------	-----------

PIŚMIENNICTWO	92
----------------------	-----------

STRESZCZENIE	104
---------------------	------------

WSTĘP

Włóknienie śródmiąższowe jest szczególnie interesującym procesem, ponieważ uważa się powszechnie, że pogorszenie funkcji nerek jest uwarunkowane przede wszystkim stopniem nasilenia zmian śródmiąższowych w wielu formach chorób nerek [1, 2, 3].

Jeżeli liczba czynnych nefronów spadnie poniżej pewnego krytycznego poziomu dochodzi, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt doświadczalnych, do niszczenia kolejnych nefronów, zaniku cewek i włóknienia śródmiąższowego [1]. Progresja przewlekłych chorób nerek jest uważana za proces nieodwracalny, który w efekcie może prowadzić do schyłkowej niewydolności nerek [2]. Jest to poważne schorzenie wymagające leczenia do końca życia czy to w formie dializoterapii czy też przeszczepienia nerki [4, 5]. Populacja chorych z przewlekłą niewydolnością nerek systematycznie wzrasta, rosną także koszty leczenia. W Stanach Zjednoczonych obliczono, że wynoszą one 7% kwoty wydawanej na leczenie, a ocenia się, że do 2020 roku mają wzrosnąć jeszcze o połowę. Dlatego ludzki i ekonomiczny wymiar tej choroby jest bardzo ważny [6, 7].

Większość pacjentów jest oczywiście obecnie diagnozowana zanim rozwinie się u nich schyłkowa niewydolność nerek, jednak nadal nie dysponujemy w pełni satysfakcjonującym leczeniem, które mogłoby zatrzymać jej postęp [8]. Patogeneza przewlekłej niewydolności nerek charakteryzuje się postępującą utratą czynności nerek, co jest związane z odkładaniem się macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) i rozsianym włóknieniem śródmiąższowym z zanikiem cewek nerkowych [9].

1. BUDOWA ŚRÓDMIĄSZU KORY I RDZENIA NERKI

W obrębie nerki śródmiaższ stanowi niewielki odsetek objętości narządu. Pełni on rolę podtrzymującą utkanie rdzenia oraz umożliwia funkcjonowanie systemu wymiennika przeciwprądowego. **Część korowa zdrowej nerki zawiera minimalną ilość tkanki łącznej śródmiaższowej**, cewki nerkowe są ułożone bardzo blisko siebie, a w przestrzeniach między cewkowymi znajdują się głównie naczynia krwionośne włosowate i limfatyczne. Trudno je dostrzec w preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną, nie są także lepiej widoczne przy użyciu specjalnych barwień. Widać je dopiero wyraźniej, gdy nerka jest przekrwiona i ulegają one poszerzeniu [10]. Śródmiaższ składa się z mikrowłókienek macierzy o długości 15-30nm, kolagenu typu I, II i VI, glikozaminoglikanów, glikoprotein (np. fibronektyny) oraz płynu. Ocenia się, że objętość śródmiaższu w części korowej zdrowej nerki waha się u ludzi od 5-20% [11, 12]. Śródmiaższ części korowej dzieli się na:

- 1/ śródmiaższ około cewkowy, w którym mieszczą się rezydujące fibroblasty, nieliczne komórki układu immunologicznego (komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty) oraz naczynia włosowate.
- 2/ śródmiaższ około naczyniowy stanowi bogata w płyn luźna tkanka łączna otaczająca tętniczki, z jednej strony łącząca się z tkanką łączną miedniczki, a z drugiej sięgająca tętniczki doprowadzającej; mieszczą się tu fibroblasty, makrofagi, niewielkie włókna nerwowe i naczynia limfatyczne [11, 12].

Zawartość śródmiaższu w części rdzennej jest wyraźnie większa. Jego ilość wzrasta od podstawy piramid do szczytu brodawk i może stanowić nawet około 30-40% całkowitej objętości [12]. Obecne są tu komórki i substancja pozakomórkowa zawierająca głównie glikozaminoglikany. Włókna kolagenowe są nieliczne. Znajduje się tu również materiał o charakterze błon podstawnych [13].

Najliczniejsze i najważniejsze komórki śródmiaższu to fibroblasty. Stanowią one strukturalną podporę nerki, biorą udział w tworzeniu macierzy pozakomórkowej i w procesach immunologicznych. Fibroblasty rezydujące w

śródmiaższu to nienabłonkowe, nienaczyniowe, mezenchymalne, wrzecionowate komórki będące w warunkach fizjologicznych jedynym producentem białek ECM (fibronektyny, kolagenu typu I, III, V) [14]. Są one także źródłem proteaz degradujących ECM, przede wszystkim metaloproteinaz. Pełnią więc główną rolę w utrzymywaniu homeostazy macierzy pozakomórkowej regulując wytwarzanie jej poszczególnych składowych [15]. Fibroblasty rezydujące w śródmiaższu posiadają niewiele swoistych markerów, więc odróżnienie ich od innych komórek mezenchymalnych (pericyty, komórki mięśniowe gładkie ścian naczyń) może nie być łatwe [2].

W różnych lokalizacjach występują różne formy rezydujących fibroblastów. W badaniach ultrastrukturalnych wszystkie posiadają liczne organelle biorące udział w produkcji białek, takie jak siateczka śródplazmatyczna, wolne rybosomy czy aparat Golgiego. Znacznie mniej liczne są inne organelle. Charakterystyczne jest gwiazdkowatego kształtu jądro i cytoszkielet zbudowany z mikrowłókienek aktyny tworzących tzw. blaszki cytoplazmatyczne (przypominają one połączenia typu pośredniego), które łączą fibroblasty ze sobą, a także kotwiczą je w błonie podstawnej sąsiadujących cewek, kłębuszków czy naczyń (fot. 1) [16]. Wyróżnia się 4 główne typy fibroblastów rezydujących w śródmiaższu [11]:

1/ Fibroblasty otaczające tętniczki zawierają jeszcze większą liczbę organelli komórkowych i bardziej obfity cytoszkielet włókien aktyny w cytoplazmie w porównaniu z fibroblastami śródmiaższu części korowej nerki.

2/ Fibroblasty śródmiaższu części korowej nerki posiadają długie, cienkie i rozgałęziające się wypustki tworzące trójwymiarową przestrzenną strukturę łączącą komórki i macierz, spełniającą funkcję podporową dla sąsiadujących cewek, kłębuszków i naczyń. Wykazano także, że mogą one produkować erytropoetynę [16].

3/ Fibroblasty śródmiaższu części rdzennej nerki różnią się w zależności od lokalizacji. Fibroblasty części zewnętrznej rdzenia przypominają komórki rezydujące w korze dookoła cewek, natomiast w części wewnętrznej rdzenia mają bardziej bogaty cytoszkielet, grubsze wypustki i silnie poszerzone kanały

siateczki śródplazmatycznej. Leżą one poprzecznie w stosunku do długiej osi cewek, co przypomina układ szczebelków w drabinie. W komórkach tych można ujawnić obecność aktyny mięśni gładkich. Nie jest ona w warunkach prawidłowych obecna w fibroblastach śródmiąższu części korowej, a pojawia się jedynie w komórkach aktywowanych [11].

4/ Fibroblasty zawierające lipidy (ang. *renal medullary interstitial cells*) występują głównie w wewnętrznej części rdzenia. Oprócz produkcji białek macierzy oraz funkcji podtrzymującej, komórki te posiadają właściwości endokrynne. Zawierają one głównie trójglicerydy bogate w nienasycone kwasy tłuszczowe, łącznie z kwasem arachidonowym, fosfolipidami i cholesterolem, które są prekursorami prostaglandyn. Badania komórek pochodzących z hodowli ujawniły, że produkują one prostaglandyny, głównie PGE₂, dlatego przypisuje się im również rolę przeciw-nadciśnieniową. W doświadczeniach prowadzących do powstania nadciśnienia, wykazano zmniejszenie liczby kropli lipidowych. Nie wyjaśniono jednak dotąd mechanizmu tego zjawiska [11, 13].

Drugą najliczniejszą po rezydujących fibroblastach populacją komórek występujących w śródmiąższu są komórki dendrytyczne wywodzące się ze szpiku kostnego, a zlokalizowane w przestrzeniach okołocewkowych kory i rdzenia. Morfologicznie przypominają fibroblasty, różnią się tym, że nie posiadają cytoszkieletu aktynowego i blaszek cytoplazmatycznych, ich jądra są okrągłe, a nie gwiazdkowate. Ich zadaniem jest prezentacja antygenów limfocytom T. Komórki dendrytyczne szybko opuszczają nerki i naczyniami limfatycznymi przemieszczają się do narządów limfatycznych [17]. W tkance łącznej okołonaczyniowej obecne są jeszcze fagocytykujące makrofagi, w zdrowej nerce rzadko zdarzają się limfocyty, a neutrofile i komórki plazmatyczne są praktycznie nieobecne [11].

2. ŚRÓDMIĄŻSZ NERKI W WARUNKACH PATOLOGICZNYCH

Objętość śródmiąszu zwiększa się w warunkach patologicznych. Zagadnienie to jest niezwykle ważne w patologii nerek u człowieka. Włóknienie śródmiąszowe jest bowiem wykładnikiem progresji chorób nerkowych, w tym zapaleń kłębuszkowych. Uważa się powszechnie, że pogorszenie funkcji nerek jest uwarunkowane przede wszystkim stopniem nasilenia zmian śródmiąszowych [18, 19, 20]. Komórki występujące w śródmiąszu oraz macierz pozakomórkowa odgrywają ważną rolę w czasie rozwoju embrionalnego nerki, zależy od nich także w jaki sposób będzie postępowało uszkodzenie nerki w przebiegu różnych chorób. Pod wpływem cytokin, czynników wzrostu i innych cząsteczek komórki rezydujące w śródmiąszu mogą dzielić się lub ulegać przekształceniu w komórki podobne do miofibroblastów, które mają znacznie większe zdolności do produkcji białek macierzy pozakomórkowej i w konsekwencji rozwoju włóknienia śródmiąszowego [11].

Włóknienie śródmiąszowe towarzyszy wszystkim przewlekłym glomerulopatiom począwszy od zapaleń kłębuszkowych pierwotnych i wtórnych, poprzez glomerulopatie wrodzone, glomerulopatie związane z chorobami metabolicznymi i nadciśnieniem. W przypadku zapaleń kłębuszkowych zmiany śródmiąszowe początkowo występują ogniskowo. Często są to niewielkie, plamkowate ogniska. W miarę postępu choroby ogniska włóknienia występują coraz liczniej i są coraz bardziej rozległe.

W końcu lat 60-tych XX wieku zaczęto badać zależności pomiędzy czynnością nerek a zmianami morfologicznymi, w tym także włóknieniem śródmiąszowym, u chorych z przewlekłymi kłębuszkowymi zapaleniami nerek. Risdon i wsp. jako pierwsi ujawnili, że to nie zmiany kłębuszkowe a nasilenie włóknienia śródmiąszowego ma większy wpływ na funkcjonowanie nerek [19]. Podobne rezultaty osiągnęli Bohle i wsp., którzy badali relacje pomiędzy objętością śródmiąszu a poziomem kreatyniny w zmianach minimalnych (ang. *minimal change disease*, MCD, łac. *glomerulonephritis*

submicroscopica), w ogniskowym segmentalnym stwardnieniu kłębuszków nerkowych (ang. *focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS) oraz w zapaleniu ostrym wewnątrzwłósniczkowym i rozplemowym mezangialnym [21, 22]. Ich doniesienia potwierdziło później wielu autorów w odniesieniu do glomerulopatii błoniastej [23] i nefropatii IgA [24, 25, 26].

W przypadkach glomerulopatii włóknienie śródmiąższowe jest warunkowane nie tylko zmianami kłębuszkowymi, ale prawdopodobnie również różnymi czynnikami pozakłębuszkowymi, w tym przede wszystkim cewkowymi. Wielu autorów próbowało znaleźć związek pomiędzy nasileniem zmian kłębuszkowych a stopniem włóknienia śródmiąższowego, biorąc pod uwagę fakt, że pierwotnie proces chorobowy zajmuje kłębuszki. Okazało się, że nie zawsze rozległość zmian śródmiąższowych jest w sposób wyraźny związana z nasileniem zmian w obrębie kłębuszków. Bohle i wsp. nie zdołali odnaleźć takiej zależności w FSGS [21]. Mackensen-Haen i wsp. ujawnili, że obecność nawet bardzo zaawansowanych zmian kłębuszkowych nie była związana z obniżeniem funkcji nerek, jeśli nie towarzyszył jej wzrost objętości śródmiąższu i włóknienie śródmiąższowe [18]. Podobnie w nefropatii błoniastej Danilewicz i wsp. znaleźli jedynie słabą korelację pomiędzy postępem zmian kłębuszkowych a zwiększoną objętością śródmiąższu [23]. Woźniak i wsp. nie zaobserwowali powiązań między nasileniem sklerotyzacji kłębuszków we wczesnej fazie FSGS a włóknieniem śródmiąższowym [27]. Widstam-Attorps i wsp. również zaobserwowali, że w nefropatii IgA zmiany mezangialne i śródmiąższowe były od siebie niezależne [28]. Jedynie Katafuchi i wsp. znaleźli zależność pomiędzy nasileniem zmian śródmiąższowych i kłębuszkowych w przypadkach zapalenia mezangialnego rozplemowego [29].

3. ROLA MIOFIBROBLASTÓW WE WŁÓKNIENIU ŚRÓDMIĄŻSZU

Miofibroblasty posiadają unikalne właściwości kurczliwe [30] i są w procesie włóknienia śródmiąższowego uważane za aktywowaną formę fibroblastów odpowiedzialną za gromadzenie białek macierzy pozakomórkowej [15]. Miofibroblasty to duże komórki, posiadające długie wypustki, przypominają jednocześnie fibroblasty i komórki mięśniowe gładkie ścian naczyń. W badaniu ultrastrukturalnym charakteryzują się obecnością wiązek mikrofilamentów, dobrze rozwiniętej siateczki śródplazmatycznej i hemidesmosomów [31]. Ich identyfikacja jest często oparta o ujawnienie aktywności mięśni gładkich (ang. *α -smooth muscle actin*, α -SMA) [30]. Należy jednak pamiętać, że antygen ten jest obecny także w innych komórkach linii mezenchymalnej (komórki mięśniowe gładkie ścian naczyń, pericyty) [32].

Rola miofibroblastów we włóknieniu śródmiąższowym nie podlega dyskusji, natomiast ich pochodzenie i procesy aktywacji nie są ostatecznie zdefiniowane [9, 33]. Aż do lat 90-tych XX wieku nikt nie kwestionował, że włóknienie śródmiąższowe w różnych narządach rozwija się w wyniku lokalnej proliferacji rezydujących fibroblastów, które przekształcają się w miofibroblasty i produkują macierz pozakomórkową [34]. Dopiero później pojawiły się liczne doniesienia dotyczące innych możliwości, a przede wszystkim transformacji komórek nabłonka w komórki mezenchymalne [9, 15, 35, 36, 37, 38].

Postuluje się obecnie następujące źródła pochodzenia miofibroblastów:

1. Transformacja komórek nabłonka w komórki mezenchymalne (ang. *epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT).
2. Lokalna aktywacja rezydujących fibroblastów.
3. Proliferacja rezydujących komórek mięśniowych gładkich ścian naczyń i pericytów [9, 33].

Ad. 1. Transformacja komórek nabłonka w komórki mezenchymalne

Transformacja komórek nabłonka w komórki mezenchymalne to proces, w którym komórki nabłonka cewek tracą swój nabłonkowy fenotyp i nabierają cech komórek mezenchymalnych. Przez wiele lat uważano, że jest to główne źródło miofibroblastów, natomiast w ostatnio opublikowanych pracach pojawiają się istotne wątpliwości [1, 34, 39]. Obecnie przeważa pogląd, że około 1/3 wszystkich miofibroblastów w przewlekłych chorobach nerek może wywodzić się z komórek nabłonków cewek [33]. Proces EMT ilustruje plastyczność komórek nabłonka, ale przede wszystkim jest związany z tworzeniem miofibroblastów zdolnych do produkcji białek ECM w warunkach patologicznych [9]. Trzeba przy tym podkreślić, że cewki nerkowe u dorosłych (z wyjątkiem cewek zbiorczych) wywodzą się z mezenchymy *metanephros* w procesie MET (ang. *mesenchymal-to-epithelial transdifferentiation*) [40]. Można w związku z tym uznać proces EMT za odwrócenie embriogenezy [9].

Obecność EMT we włóknieniu śródmiąższowym została po raz pierwszy zademonstrowana przez Strutza i wsp., którzy w badaniach doświadczalnych wykazali obecność białka swoistego dla fibroblastów – Fsp1 (ang. *fibroblast-specific protein 1*) w komórkach nabłonka cewek [38]. Następnie wykryto ekspresję *de novo* α -SMA i filamentów aktyny w komórkach nabłonków cewek [41], a także komórki będące w stadium przejściowym transformacji komórek nabłonka w miofibroblasty, które oprócz α -SMA miały markery typowe dla komórek nabłonków cewek [35]. Potwierdzeniem może być również zastosowanie selektywnej genetycznej blokady tego procesu w warunkach doświadczalnych, które zdecydowanie zmniejszyło nasilenie włóknienia śródmiąższowego [9].

EMT jest stopniowym procesem obejmującym 4 główne fazy:

1. utrata adhezji komórek nabłonka cewek,
2. ekspresja *de novo* α -SMA i włókien aktyny,
3. zniszczenie błony podstawnej cewek,
4. migracja komórek i ewentualna inwazja [35].

Ad. 1. Utrata adhezji komórek nabłonka cewek

W warunkach prawidłowych komórki nabłonka cewek są ściśle ze sobą połączone. Jednym z głównych białek odpowiedzialnych za połączenie i polarność komórek nabłonka jest E-kadheryna. Udowodniono, że w początkowej fazie EMT indukowanej działaniem TGF- β 1 dochodzi do stopniowego zmniejszenia ekspresji E-kadheryny [35]. Podobną supresję zaobserwowano również w odniesieniu do innego białka połączeń ścisłych zwanego ZO-1 (ang. *zonula occludens protein 1*) [37]. Zmiany te powodują destabilizację integralności strukturalnej nabłonka cewek nerkowych, dysocjację komórek i utratę polarności [9].

Ad. 2. Ekspresja *de novo* α -SMA i włókien aktyny

E-kadheryna dzięki kateninom jest połączona z siecią włókien aktyny. Reorganizacja cytoszkieletu aktynowego wraz z pojawieniem się α -SMA *de novo* powoduje nie tylko zmianę morfologiczną transformowanych komórek, ale również nabycie przez nie takich właściwości jak zdolność do migracji i inwazji czy kurczliwość [9]. Poza cytoszkieletem aktynowym także filamenty pośrednie ulegają konwersji z typowych dla komórek nabłonka cytokeratyn do mezenchymalnej wimentyny [35].

Ad. 3. i 4. Zniszczenie błony podstawnej cewek (ang. *tubular basement membrane*, TBM) i migracja komórek w obręb śródmiąższu

TBM nie tylko oddziela komórki nabłonka cewek od miofibroblastów śródmiąższu, ale także od białek ECM – takich jak kolagen typu I, w odniesieniu do którego wykazano, że indukuje EMT [42]. Główne białka tworzące TBM to kolagen typu IV i laminina. W czasie indukcji EMT *in vitro* i *in vivo* wykazano zwiększoną ekspresję swoistych metaloproteinaz: MMP-2 i

MMP-9, które są odpowiedzialne za niszczenie właśnie kolagenu typu IV i lamininy – powodując destrukcję strukturalną i czynnościową TBM [36]. Transformowane komórki migrują następnie do śródmiaższu dookoła cewek, czyli mają one jednocześnie zdolności do niszczenia TBM i przechodzenia poza błonę podstawną cewek. Udowodniono to prowadząc badania zachowania się komórek nabłonka cewek w hodowli po stymulacji TGF- β 1 oraz w nefropatii wywołanej podwiązaniem moczowodu [35, 36]. Transformowane komórki osiedlają się w przestrzeniach okołocewkowych, gdzie promują włóknienie dzięki produkcji ECM, zawierającej głównie kolagen typu I [43, 44].

Ad. 2. Lokalna aktywacja rezydujących fibroblastów

Tradycyjnie uważano, że miofibroblasty w śródmiaższu nerki reprezentują aktywowaną populację rezydujących fibroblastów [45], które różnią się od fibroblastów w zdrowych, nieuszkodzonych nerkach [2].

Nie ma zgody co do tego, czy wzrost liczby miofibroblastów z ekspresją α -SMA jest skutkiem proliferacji tej części fibroblastów, która konstytucjonalnie posiada to białko. Istnieje także możliwość pojawienia się *de novo* ekspresji α -SMA [2]. Picard i wsp. badali morfologię fibroblastów w czasie przekształcania w miofibroblasty u zwierząt doświadczalnych (model po podwiązaniu moczowodu). Obserwowali oni pojawienie się wiązek mikrofilamentów aktyny, a także silnie rozdęte kanały siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. Dzięki zastosowaniu podwójnej immunofluorescencji udało im się ujawnić stopniowe pojawianie się α -SMA [46]. Nie jest to jedyna zmiana, gdyż w czasie aktywacji dochodzi do radykalnej zmiany fenotypu, zwiększonej aktywności proliferacyjnej i pojawienia się zdolności do produkcji białek macierzy pozakomórkowej (ECM) [47]. Rodemann i wsp. zaobserwowali, stosując znakowaną prolinę, większy potencjał proliferacyjny aktywowanych fibroblastów oraz 3-5 krotnie zwiększoną produkcję kolagenu [48]. Badania doświadczalne przeprowadzone na hodowlach komórkowych stanowią odbicie zachowania aktywowanych fibroblastów *in vivo* [47, 48]

Ad. 3. Proliferacja komórek mięśniowych gładkich ścian naczyń

W świetle prac publikowanych w ostatnich kilku latach, ale także dużo wcześniej, wydaje się, że kolejnym ważnym źródłem komórek śródmiąższu odpowiedzialnych za nadprodukcję białek macierzy mogą być rezydujące w śródmiąższu fibroblasty okołonaczyniowe, a szczególnie komórki przydanki tętniczek i tętnic [49, 50, 51, 52]. W pracach doświadczalnych prowadzonych w latach 90-tych XX wieku zaobserwowano pojawienie się populacji α -SMA dodatnich miofibroblastów w rejonach okołonaczyniowych sugerując, że złuszczenie się komórek mięśni gładkich naczyń i pericytów ma swój udział we włóknieniu śródmiąższowym [52, 53]. Do podobnego wniosku doszli także Humphreys i wsp., którzy znaleźli przekonujące dowody na to, że EMT nie odgrywa decydującej roli w procesie włóknienia śródmiąższowego. Aby uzyskać myszy, których komórki nabłonka cewek są swoiście oznakowane użyli manipulacji genetycznych. Następnie sprawdzali na dwa sposoby włóknienie śródmiąższowe:

- 1) poprzez jednostronne podwiązanie moczowodu
- 2) dzięki uszkodzeniu niedokrwienemu z reperfuzją.

Obserwowali dalej czy komórki nabłonka cewek przemieściły się w obręb śródmiąższu i czy nabyły zdolności do zachowywania się jak fibroblasty. Badania histologiczne nerek po uszkodzeniu ujawniły włóknienie śródmiąższowe i wiele komórek z ekspresją α -SMA, jako markera miofibroblastów. Nie udało się jednak znaleźć żadnych uprzednio oznakowanych komórek nabłonka cewek w obrębie śródmiąższu, ani ekspresji α -SMA w komórkach nabłonka cewek [54].

Kolejną rozważaną teorią jest pochodzenie fibroblastów śródmiąższu z krążących komórek wywodzących się ze szpiku kostnego, jednak w badaniach genetycznych prowadzonych u myszy po jednostronnym podwiązaniu moczowodu nie udało się wykazać, aby komórki wywodzące się ze szpiku mogły produkować kolagen typu I [55]. Do podobnych wniosków doszli także Lin i wsp. [50].

4. BARWIENIA HISTOLOGICZNE OBRAZUJĄCE WŁÓKNIENIE ŚRÓDMIĄŻSZU NERKI

Dla ujawnienia obecności i rozległości włóknienia śródmiąższowego stosuje się różne dodatkowe metody histologiczne. Najczęściej stosowane są: metoda van Giesona, metoda Massona i barwienie czerwienią Syriusza. Mniej przydatna jest impregnacja solami srebra (metoda Bielschowskiego, Gomoriego, Jonesa). Ujawnia ona obecność proteoglikanów czyli tzw. włókien srebrochłonnych (metoda Bielschowskiego i Gomoriego) [56] lub obecność materiału błon podstawnych czy macierzy mezangialnej (metoda Jonesa) [57]. Natomiast metoda van Giesona, Massona i barwienie czerwienią Syriusza ujawnia obecność włókien kolagenowych [56].

Czerwień Syriusza wybarwia włókna kolagenowe tkanki łącznej na czerwono-wiśniowo, nie ujawnia natomiast włókien sprężystych, błon podstawnych oraz sarkolemy. W barwieniu czerwienią Syriusza pozostałe tkanki zabarwiają się na żółto dzięki kwasowi pikrynowemu [56].

5. METODY JAKOŚCIOWE, PÓLIŁOŚCIOWE I IŁOŚCIOWE, STOSOWANE W OCENIE OBRAZÓW MORFOLOGICZNYCH

Powszechnie wiadomo, że każde rozpoznanie stawiane przez patomorfologa jest obarczone subiektywizmem. Dotyczy to zarówno oceny zwykłych preparatów histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną, jak i preparatów barwionych specjalnymi technikami histochemicznymi czy immunohistochemicznymi [58, 59]. Ocena tego samego preparatu (np. biopsatu nerki) dokonywana przez kilku patomorfologów może się różnić [60]. W diagnostyce nefropatologicznej w przypadku różnej oceny nasilenia zmian histologicznych może zmienić się także decyzja odnośnie dalszej terapii. W przypadku glomerulopatii do takich zmian należą: włóknienie śródmiąższowe, wielkość kłębuszków, przybytek macierzy mezangialnej (sklerotyzacja),

pogrubienie błon podstawnych czy wzrost liczby komórek w obszarach mezangialnych. Każdy patomorfolog w swej codziennej pracy stale napotyka trudności związane z oceną nasilenia różnych wykładników morfologicznych. Szczególnie dotyczy to niewielkich zmian, które mogą być przez jednych zakwalifikowane jako patologiczne, a przez innych uznane jeszcze za normę. W tej sytuacji nie dziwi chęć poszerzenia oceny histopatologicznej o metody obiektywizacji wyników oceny preparatów mikroskopowych.

Aby zmniejszyć udział subiektywizmu w ocenie preparatów histologicznych wprowadzono możliwość parokrotnej ich analizy w pewnym odstępie czasu, a następnie uśrednienie wyników oceny [60, 61]. Badanie przez kilku niezależnych diagnostów może więc zmniejszyć wpływ różnic pomiędzy ich ocenami czy między wynikami uzyskanymi w różnym czasie przez tego samego lekarza. Niestety skutkiem jest znaczne wydłużenie czasu oczekiwania na wynik badania histopatologicznego, na co w codziennej praktyce nie można sobie pozwolić. W związku z tym takie postępowanie może być stosowane jedynie w przypadku prac o charakterze naukowym.

W diagnostyce nefropatologicznej oprócz rozpoznania typu glomerulopatii ważna jest także ocena dodatkowych wykładników morfologicznych. Bardzo przydatne w tym względzie okazały się metody oceny półilościowej. W poszczególnych typach kłębuszkowych chorób nerek stosuje się bardzo wiele różnych systemów. Oceniają one półilościowo (zazwyczaj w kilku stopniowej skali) nasilenie różnych zmian kłębuszkowych i śródmiąższowych. Poza systemami stosowanymi od wielu lat stale pojawiają się nowe [62, 63].

Musimy jednak pamiętać, że metody oceny półilościowej, mimo iż są często stosowane i bardzo przydatne, także obarczone są ryzykiem subiektywizmu. Nie mogą więc one zastąpić obiektywnych metod ilościowych, które niestety są bardziej pracochłonne, pozwalają nie tylko na obiektywną charakterystykę badanych zmian patologicznych, ale również umożliwiają dokładną analizę statystyczną. Dlatego coraz częściej w badaniach patomorfologicznych nerek stosowana jest ocena ilościowa. Pozwala ona w

odniesieniu do zmian śródmiąższowych na ścisłe określenie rozległości i nasilenia włóknienia, a ponadto ocenę współzależności zmian kłębuszkowych i śródmiąższowych.

Do połowy lat sześćdziesiątych pomiary dotyczyły głównie określenia wielkości kłębuszków [64]. W 1965 roku ukazały się publikacje Bruna i wsp. dotyczące wyników pomiarów pola powierzchni przekroju kłębuszków oraz liczby jąder komórkowych [65]. W 1968 roku Idaka i wsp., a także Wehner i wsp. opisali metodę umożliwiającą określenie powierzchni mezangium w kłębuszkach. Zajęli się również oceną ilościową poszczególnych rodzajów komórek w kłębuszkach [66, 67]. Wreszcie dalszy rozwój metod pomiaru pozwolił na ocenę śródmiąższu kory nerki [3, 21, 22, 68, 69, 70].

Morfometria to nauka, której celem są pomiary morfologiczne, pozwalają one na ilościowy opis różnych struktur materii żywej i nieżytowej [71].

Urządzenia do cyfrowej analizy obrazu są coraz powszechniej stosowane, osobną gałęzią informatyki stało się także przetwarzanie obrazów na potrzeby medycyny. W ostatnich latach obserwujemy intensywny rozwój technik analizy obrazów medycznych, a także rozwój technologii związanej z kartami graficznymi, które dają znacznie większe możliwości analizy. Dzięki wzrostowi mocy obliczeniowej komputerów tworzone są coraz doskonalsze programy służące do przetwarzania obrazów (m. in. medycznych) [73, 74, 75, 76, 77, 78, 79]. W tych dziedzinach medycyny, które wykorzystują obrazy w diagnostyce (m. in. patomorfologia, radiologia) niezwykle ważna jest obiektywizacja, gdyż pomaga ona lub nawet decyduje o podjęciu określonej decyzji klinicznej.

Wzrokowa ocena obrazów medycznych nie jest łatwa, szczególnie gdy zliczamy jakieś obiekty (np. wybarwione metodami immunohistochemicznymi jądra komórek nowotworowych, komórki w obszarach mezangialnych, komórki nacieku zapalnego). Łatwo wtedy o popełnienie błędu. W przypadku włóknienia śródmiąższowego ocena dotyczy obszaru (pola powierzchni), którego nie da się zanalizować okiem ludzkim. Także ocena barwy może być

zafałszowana ze względu na złudzenia wzrokowe oraz towarzyszące obiektom tło, które może spowodować, że wrażliwość oka ludzkiego na kolory będzie zbyt mała [80]. W tej sytuacji użycie systemów komputerowej analizy obrazu pozwala na uniknięcie zafałszowań, gdyż analizatory obrazu mogą w sposób bezwzględny i obiektywny ocenić różne cechy morfologiczne.

Celem systemów komputerowej analizy obrazu używanych w medycynie jest akwizycja (czyli rejestracja i zapisanie obrazu w pamięci nośnika danych, np. dysk twardy komputera) oraz analiza morfometryczna. Można także przy ich użyciu archiwizować preparaty histologiczne w postaci cyfrowej [81].

6. ANALIZA CYFROWYCH OBRAZÓW MIKROSKOPOWYCH

Ponieważ odbieranie barwy przez ludzkie oko nie jest doskonałe opracowano różne modele matematyczne mające na celu zdefiniowanie barwy. Mikroskopowe barwne obrazy cyfrowe kodowane są zwykle w jednym z trzech modeli przestrzeni barwnej: RGB, HSI, CMYK [80, 82, 83]. Systemem najczęściej stosowanym w przetwarzaniu obrazów medycznych jest model RGB, z którego także korzystałam. Format ten odwzorowuje dość wiernie sposób, w jaki widzi barwy oko ludzkie. Nazwa RGB pochodzi od pierwszych liter angielskich nazw kolorów: Red (czerwony), Green (zielony), Blue (niebieski) [83]. W siatkówce oka ludzkiego znajdują się trzy typy czopków wrażliwych na wiązki światła o różnej długości fali elektromagnetycznej, odbieranej jako barwa czerwona, zielona i niebieska. Są to trzy główne kolory widziane przez człowieka, a cała reszta palety barw powstaje przez mieszanie w różnych proporcjach głównych kolorów. Ta właściwość ludzkiego widzenia spowodowała, że rozwój urządzeń elektronicznych także bazuje na systemach trójkolorowych [83]. W modelu RGB zwykle stosuje się 24 bitowy zapis informacji (po 8 bitów na każdy z trzech kolorów). W związku z tym każda barwa ma wartość od 0 do 255 (2^8 , łącznie 256 kombinacji), a model RGB pozwala na opisanie ok. 16,7 miliona kolorów (256^3 , 16 777 216). W formacie RGB „0” oznacza kolor czarny, natomiast „255” kolor biały. Biorąc pod uwagę fakt, że ludzkie oko nie jest w stanie rozróżnić tylu barw – katalog Pantone wydawany dla grafików, którzy wybierają kolory do druku obejmuje około kilkunastu tysięcy barw – model RGB daje możliwość klasyfikacji odcieni wielu kolorów stosowanych w technikach histochemicznych i wartościowania ich w 24 bitowym systemie zapisu informacji [72, 83].

Kodowanie obrazów ultrastrukturalnych lub z mikroskopu fluorescencyjnego jest dużo łatwiejsze, ponieważ występują tam jedynie różne odcienie szarości. W analizie morfometrycznej także konwertuje się barwne obrazy świetlno-mikroskopowe do odcieni szarości [84, 85, 86].

7. ILOŚCIOWA ANALIZA OBRAZÓW BIOMEDYCZNYCH

Komputerowe metody analizy obrazu są coraz powszechniej stosowane w medycynie (szczególnie w patomorfologii czy radiologii). Metody manualne czyli pomiary przy pomocy mikrometru (okularu mikrometrycznego), kątomierzy czy planimetrów są obecnie używane coraz rzadziej [87, 88]. Nadal korzysta się z różnego rodzaju siatek morfometrycznych (kwadratowe siatki Hauge'a, krzywoliniowe Merza czy heksagonalne), przy pomocy których można ocenić liczbę struktur, przecięcia profili obiektów, można także zliczać badane elementy czy określić różne parametry stereologiczne [87, 88, 89, 90].

7.1. METODY PÓŁAUTOMATYCZNE I AUTOMATYCZNE

Wprowadzenie do powszechnego użytku coraz tańszych urządzeń elektronicznych (kamery, aparaty cyfrowe, komputery z oprogramowaniem) służących do akwizycji i przetwarzania obrazów medycznych stało się przełomowym momentem na drodze do pokonania głównego ograniczenia metod morfometrycznych jakim jest duży nakład pracy. Pierwszym etapem komputerowej analizy obrazu, zarówno półautomatycznej, jak i automatycznej, jest wprowadzenie do pamięci komputera zdjęć preparatów histologicznych. W przypadku badań nefropatologicznych obrazów z mikroskopu świetlnego służy do tego kamera sprzężona z mikroskopem optycznym, natomiast w celu analizy zdjęć ultrastrukturalnych można zastosować skaner (jeśli nie dysponujemy zdjęciami w formie cyfrowej).

Półautomatyczne metody analizy obrazu początkowo służyły do pomiarów długości odcinków, krzywych, pola powierzchni czy interaktywnego liczenia wybranych obiektów o określonym kształcie lub kolorze. Metody te dawały dobre wyniki, gdy oceniano stosunkowo duże, a także niezbyt liczne obiekty, takie jak kłębuszki nerkowe [91]. W przypadku mierzenia obiektów o znacznym rozproszeniu (np. ognisk włóknienia śródmiąższowego) używano programów obejmujących funkcje stereologiczne. Umożliwiało to analizę

morfometryczną punktową lub liniową dzięki użyciu siatek pomiarowych (przykładowo program MultiScan v.4.01, pracujący w środowisku Windows).

Obecnie stosuje się liczne, wyspecjalizowane systemy dostępne komercyjnie. Mimo, że w wielu z nich przetwarzanie obrazów jest w dużej części zautomatyzowane, konieczny jest jednak udział osoby dokonującej analizy, która wybiera odpowiednie parametry każdego analizowanego obrazu [59, 92, 93, 94].

W mojej rozprawie do analizy półautomatycznej wybrałam oprogramowanie Image J dostępne z <http://rsb.web.gov/ij/>, tworzone w systemie licencji OPEN SOFTWARE. Jest ono powszechnie używane i może działać w różnych systemach operacyjnych. Jego użytkownicy dodają nowe funkcje tzw. wtyczki (ang. *plug-in*), które poszerzają możliwości jego zastosowania. Inne szeroko stosowane oprogramowania to: Photoshop [95], Matlab [96] oraz Image Pro Analysis Software [97]. Ponieważ są to aplikacje komercyjne, stworzone w celu realizacji określonych zadań, w sytuacji potrzeby zmiany parametrów lub w przypadku innych, niż powszechnie stosowane metod diagnostycznych, nie są one w stanie spełnić określonych wymagań użytkowników. W programach tych nie ma oczywiście możliwości jakiegokolwiek zmiany algorytmu oprogramowania.

Z punktu widzenia badaczy dokonujących analizy morfometrycznej obrazów medycznych najlepsze są oczywiście systemy automatyczne. Powstają one dzięki współpracy lekarzy różnych specjalności i inżynierów (informatyków, automatyków), którzy realizują określone potrzeby naukowe lub diagnostyczne. Automatyczna cyfrowa analiza obrazu to procedura, w której bez żadnych działań interaktywnych otrzymujemy zarówno obraz wynikowy, jak i dane liczbowe, wyłącznie jako efekt działania programu [98]. Automatyczne analizatory obrazu nie wymagają ingerencji ze strony użytkownika, co pozwala znacznie zwiększyć liczbę przetwarzanych obrazów mikroskopowych w określonym czasie. Powoduje to istotne nakładu pracy, a zatem zwiększa możliwości użycia takich programów w codziennej praktyce patomorfologicznej. Kolejną zaletą jest fakt, że są to zwykle autorskie,

wysokospecjalistyczne oprogramowania, stworzone w określonym celu, w związku z tym, pozbawione niepotrzebnych funkcji. W razie dodatkowych, nowych potrzeb mogą one być odpowiednio zmieniane [59, 60, 99].

7.2. ETAPY KOMPUTEROWEJ ANALIZY OBRAZÓW MIKROSKOPOWYCH

Mimo różnych zastosowań programów do komputerowej analizy obrazu poszczególne etapy ich działania są podobne. Jak już wcześniej wspomniałam, podstawą jest wprowadzenie obrazów mikroskopowych z różnych źródeł (kamera, skaner, aparat cyfrowy czy system *aperio scan scope*, sprzężone z mikroskopem), które następnie są przechowywane w pamięci komputera [61, 96]. W procesie rejestracji sygnał analogowy (obraz mikroskopowy) jest digitalizowany i rejestrowany w pamięci komputera w formie pikseli (ang. *picture units*) w różnych formatach.

Dwa stosunkowo często stosowane w naukach biomedycznych to format .tiff (ang. *Tagged Image File Format*) i .jpg (ang. *Joint Photographic Experts Group*). Format .tiff należy do najlepszych [97, 100]. Zaletą tego zapisu jest możliwość kompresji bezstratnej, czyli metody kompresji informacji do postaci zawierającej zmniejszoną liczbę bitów, a gwarantującej odtworzenie informacji z postaci skompresowanej do identycznej postaci pierwotnej. Obrazy zapisywane jako .tiff mają wiele megabajtów (ok. 5 do 20-krotnie więcej niż format .jpeg) i dlatego znacznie obciążają pamięć operacyjną urządzeń [www.scantips.com/basics09.html].

W codziennej praktyce klinicznej najczęstszym formatem cyfrowych obrazów medycznych jest .jpeg (ang. *Joint Photographic Experts Group*). W tym formacie stosuje się metodę kompresji statycznych obrazów rastrowych, przeznaczoną głównie do stratnego zapisu obrazów charakteryzujących się płynnymi przejściami barw oraz brakiem lub małą ilością ostrych krawędzi i drobnych detali. Format .jpeg, w przeciwieństwie do .tiff, zajmuje zdecydowanie mniej miejsca i tym samym powoduje szybszą pracę systemów opera-

cyjnych i programów graficznych [100, www.scantips.com/basics09.html].

Następnym etapem jest poprawienie jakości obrazu przy pomocy programów graficznych. Współczesne programy graficzne charakteryzują się możliwością pracy z obrazami o wysokiej rozdzielczości (najczęściej 480x640, 512x512, 960x1280 pikseli). Obrazy takie mogą być poddawane precyzyjnej korekcji poprzez poprawianie jasności, kontrastu oraz cyfrowej filtracji w celu wyodrębnienia struktur do dalszych pomiarów [74, 94, 101, 102].

Użycie filtrów polega na wykonaniu operacji matematycznych na pikselach obrazu źródłowego, których skutkiem jest nowy, przekształcony obraz. Filtry stosuje się celem wydobywania z oryginalnego obrazu szeregu informacji, które poddaje się dalszej obróbce. Informacjami takimi mogą być: położenie krawędzi czy pozycje rogów obiektów. Innym zastosowaniem filtracji jest usuwanie szumów (filtr medianowy i inne) lub rozmycie obrazu (filtr Gaussa), co pozwala wyodrębnić ważne dla analizy struktury z mniej czytelnych obrazów [102]. Umożliwia to rozpoczęcie dalszych działań w komputerowej analizie obrazów czyli segmentację. Jest to etap o strategicznym znaczeniu dla dalszych badań. Istnieją różne metody segmentacji obrazu (progowanie, wykrywanie krawędzi, rozdzielenie nachodzących na siebie struktur algorytmami „działów wodnych”), dlatego wybór adekwatnej metody ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego przeprowadzenia analizy morfometrycznej. W przypadku nauk biomedycznych zwykle stosuje się segmentację przez progowanie [103], której także użyłam w mojej pracy, dlatego szerzej omówię jej zasadę. Metoda ta polega na określeniu wartości progowej w skali jasności obrazu (histogram rozkładu jasności), następnie każdy element obrazu (piksel) jest przydzielany do jednej z dwóch kategorii: o wartości większej bądź równej wartości progowej lub o wartości mniejszej od wartości progowej. Po tej operacji uzyskuje się obraz binarny, składający się z zer i jedynek. Wartość „0” może oznaczać kolor czarny, a wartość „1” kolor biały (zależy to od wyboru dokonanego przez badacza). Następnie punkty o odpowiedniej wartości są poddawane analizie ilościowej.

Najważniejszym momentem w procesie segmentacji przez progowanie

jest wyznaczenie wartości progowej, jeżeli nie zostanie ona prawidłowo ustalona to staje się źródłem błędu, którego nie można w żaden sposób skorygować [104]. Gdy wartość progu jest ustalana na podstawie całego obrazu mamy do czynienia z wyznaczaniem progu globalnego, a jeżeli wartość progowa ustalana jest indywidualnie dla poszczególnych obszarów obrazu to próg określany jest mianem lokalnego [105]. Progowanie globalne przebiega stosunkowo szybko, chociaż mniej dokładnie wyznacza granice badanych struktur. Najczęściej stosowaną metodą globalną jest progowanie manualne. Wartość progowa jest ustalana przez badacza indywidualnie dla każdego analizowanego zdjęcia. Istotnym udogodnieniem w czasie progowania manualnego jest możliwość podglądu histogramu, czyli wektora zawierającego informację o liczbie punktów o określonych cechach [72].

Końcowe działania to analiza ilościowa polegająca na określeniu liczby obiektów lub zajmowanej przez nie powierzchni na badanym obrazie.

CELE PRACY

1. Zastosowanie metod komputerowej analizy obrazu pozwalających na obiektywną ocenę nasilenia włóknienia śródmiąższowego.
2. Porównanie wartości uzyskanych metodą półautomatyczną i automatyczną.
3. Określenie pracochłonności obu metod morfometrycznych analizy nasilenia włóknienia śródmiąższowego, pod kątem możliwości ich zastosowania w codziennej diagnostyce biopsji nerek.
4. Odniesienie uzyskanych wyników pomiarów włóknienia śródmiąższowego do stanu klinicznego chorych (w czasie biopsji, po dwóch latach obserwacji i po 10 latach obserwacji).

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem analizy są wyniki badań morfologicznych świetlno-mikroskopowych, elektronowo-mikroskopowych, immunofluorescencyjnych i morfometrycznych biopsji nerek wykonanych u 39 chorych z różnymi typami zmian kłębuszkowych. U wszystkich chorych analizie poddano także uzyskane dane kliniczne. Największą grupę (22 przypadki) stanowili chorzy, u których rozpoznano ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS) (fot. 3, 4). W 5 przypadkach wykonano rebiopsję i badaniom morfometrycznym poddano punktaty nerek pochodzące z obu biopsji. W kolejnej grupie znalazło się 6 chorych z rozpoznaniem nefropatii IgA, u których stwierdzono klasę IV, tzn. zmiany rozplemowe rozlane (fot. 5). Następną grupę stanowili chorzy z glomerulopatią błoniastą (6 przypadków) (fot. 6). Badaniu poddano także bioptaty 5 chorych z zapaleniem błoniasto-rozplemowym, w 2 przypadkach z tej grupy także wykonano rebiopsję (fot. 7).

Grupę kontrolną (20 przypadków) stanowiły fragmenty nerek osób bez schorzeń nerek, u których usunięto narząd z powodu urazów komunikacyjnych. Dane kliniczne w żadnym z przypadków grupy kontrolnej nie ujawniały istnienia choroby nerek. Nie można było uzyskać wyników badań klinicznych pacjentów z tej grupy, ponieważ zabiegi operacyjne były przeprowadzane w trybie nagłym – ze względu na konieczność ratowania życia. Do analizy morfometrycznej w przypadkach grupy kontrolnej wybierano losowo fragment skrawka zbliżony wielkością do wielkości biopsji nerki (fot. 2).

Obydwie grupy (badana i kontrolna) zostały wybrane z materiału archiwalnego Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej UM w Poznaniu. Zbiory Katedry liczą ponad 5500 biopsji nerek. Oceny typu glomerulopatii dokonało, niezależnie od siebie, dwóch patomorfologów z tejże Katedry (Prof. dr hab. Wiesława Salwa-Żurawska, Dr hab. Prof. UM Aldona Woźniak). Chorzy byli hospitalizowani i mieli wykonane biopsje nerek w latach 1993-2003 w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych UM w Poznaniu (Kierownik: Prof. dr hab. Kazimierz Bączyk).

1. BADANIA ŚWIETLNO-MIKROSKOPOWE, ULTRASTRUKTURALNE I IMMUNOFLUORESCENCYJNE

Rozpoznanie ustalono w oparciu o badanie świetlno-mikroskopowe, ultrastrukturalne i w większości przypadków także dzięki wynikom badania immunofluorescencyjnego. Fragmenty punktatów przeznaczone do badania świetlno-mikroskopowego po utrwaleniu w obojętnym roztworze zbuforowanej 10% formaliny były rutynowo przeprowadzane, zatapiane w bloczki parafinowe, krojone na mikrotomie firmy Leica na skrawki grubości 2-3 μ m, barwione podstawową metodą H&E oraz impregnowane solami srebra wg metody Jonesa. W części przypadków dla celów diagnostycznych wykonywano reakcję paS lub barwiono skrawki wg metody trójbarwnej Massona. Dodatkowo we wszystkich badanych przypadkach (materiał pochodzący z pierwszej biopsji i w części przypadków z rebiopsji) po wyszukaniu bloczków parafinowych wykonano barwienie czerwienią Syriusza, które służyło do dalszych analiz morfometrycznych.

Materiał przeznaczony do badania w transmisyjnym mikroskopie elektronowym utrwalano w 3,6% roztworze buforowanego glutaraldehydu o pH 7,34 i temperaturze 4°C przez 24 godziny. Następnego dnia wykrawano skrawki o wymiarach 2x2x1mm i umieszczano w 0,1M buforze kakodylowym na następne 24 godziny. Kolejnego dnia materiał osmowano w 1% OsO₄ wg metody Milloniga i odwadniano przeprowadzając przez szereg alkoholowo-acetonowy. Następnie zatapiano skrawki w mieszaninie aceton:epon kolejno w stosunku 1:1 na 60 minut, w stosunku 1:3 na 60 minut, a na koniec w czystej żywicy epoksydowej Epon 812. Materiał zatopiony w żywicy umieszczano w cieplarni w temperaturze 40°C na 24 godziny, a następnie w temperaturze 60°C do czasu spolimeryzowania. Z bloczków eponowych sporządzano skrawki półciénkie grubości 0,5-0,1 μ m, które po dobarwieniu 0,5% błękitem toluidyny w 1% boraksie oceniano w mikroskopie świetlnym. Skrawki ultracienne grubości 60-80nm kontrastowano 9% nasynionym octanem uranylu przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przepłukiwano wodą bidestylowaną i

dobarwiano 0,625% cytrynianem ołowiu przez 10 minut w temperaturze pokojowej i ponownie przemywano wodą bidestylowaną. Materiał fotografowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym firmy Zeiss model EM 900 lub EM 10 (przygotowanie materiału do dalszej oceny morfologicznej wykonano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej pod kierownictwem Prof. dr hab. Wiesławy Biczysko).

W większości ocenianych przypadków (N=37) wykonano badanie immunofluorescencyjne świeżego materiału. Te badania przeprowadzono w Katedrze Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu (kierownikiem w ówczesnym czasie był Prof. dr hab. Jan Żeromski). Materiał biopsyjny pobrany i dostarczony w gaziku nasączonym 0,9% NaCl zamrażano w medium (Tissue Freezing Medium) w mieszaninie zamrażającej (eter naftowy, aceton, suchy lód) w -70°C . Skrawki kriostatowe grubości $4\mu\text{m}$ poddawano bezpośredniej reakcji immunofluorescencyjnej. Po utrwaleniu skrawków w zimnej mieszaninie alkoholu z acetonem [1:1] przez 10 minut, suszono je przez 15 minut pod wiatrakiem i nakrapiano PBS oraz inkubowano przez 5 minut. Następnie nakrapiano przeciwciała antyludzkie przeciwko immunoglobulinom A, G, M, składowym dopełniacza C3, C4, C1q oraz fibrynogenowi znakowane izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Po inkubacji trwającej 30 minut skrawki płukano trzykrotnie w PBS przez 10 minut i zamykano w glicerolu pod szkiełkiem nakrywkowym. W mikroskopie fluorescencyjnym oceniano obecność, skład i lokalizację złogów immunoglobulin (IgG, IgA, IgM), frakcji dopełniacza (C3, C4, C1q) i fibrynogenu.

Ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS) (łac. *glomerulosclerosis focalis et segmentalis*, ang. *focal segmental glomerulosclerosis*) rozpoznano w oparciu o następujące powszechnie stosowane kryteria [106]:

- kłębuszki z obecnością mniejszych lub większych ognisk segmentalnej sklerotyzacji (skutek wzrostu ilości macierzy mezangialnej) (fot. 4),
- obecność w części przypadków ognisk szklwienia (homogeny, eozynochłonny materiał paS dodatni, barwiący się czerwono wg metody

trójbarwej Massona, a nieimpregnujący się solami srebra wg metody Jonesa), które niekiedy zawierają piankowate komórki śródbłonkowe obładowane lipidami,

- zwykle liczne całkowicie sklerotycznie zmienione kłębuszki,
- obecność zlepow lub zrostów pomiędzy segmentami zmienionymi sklerotycznie a torebką Bowmana,
- ogniska włóknienia w śródmiaższu z zanikiem cewek (fot. 3, 4), często towarzyszące całkowicie sklerotycznie zmienionym kłębuszkom,
- grupy komórek piankowatych w śródmiaższu,
- w badaniu ultrastrukturalnym obecność segmentalnych obszarów przybytku macierzy, którym towarzyszy nierównomierne pogrubienie błon podstawnych, elektronowo-gęste złogi, znikanie wypustek nóżkowatych podocytów, zrosty między torebką Bowmana a ogniskami przybytku macierzy [106, 107, 108].

Obecnie wyróżnia się kilka wariantów morfologicznych FSGS: tzw. podtyp niespecyficzny – NOS (ang. *no other specified*), podtyp z hipercellularnością mezangialną, podtyp ze szkliwieniem, podtyp biegunowy (ang. *glomerular tip lesion*), podtyp komórkowy z zapadaniem się błon podstawnych (ang. *the cellular lesion of FSGS and collapsing glomerulopathy*) [108]. We wszystkich badanych przypadkach rozpoznano podtyp niespecyficzny FSGS.

Kolejną grupę stanowili chorzy z nefropatią IgA, u których rozpoznano IV klasę zmian wg Haasa – zmiany rozplemowe rozlane:

- zwiększona komórkowość w ponad połowie kłębuszków (po wyłączeniu całkowicie sklerotycznie zmienionych), dotycząca obszarów mezangialnych (fot. 5), a także możliwy rozplem śródwłośniczkowy,
- obecność w części przypadków nielicznych półksiężycowatych zrostów komórkowych, martwica ścian pojedynczych włośniczek,
- w badaniu ultrastrukturalnym elektronowo-gęste złogi w poszerzonych obszarach mezangialnych [109].

Następną badaną podgrupę stanowili chorzy z nefropatią błoniastą, u których rozpoznania ustalano w oparciu o niżej wymienione zmiany:

- obecność rozlanego, równomiernego pogrubienia ścian włóśniczek kłębuszkowych, które może nawet czasami powodować wyraźne zwężenie ich światła (fot. 6),
- w preparatach impregnowanych solami srebra wg metody Jonesa stwierdzano charakterystyczne „kolce” odchodzące od błony podstawnej, a będące jej odpowiedzią na obecność złogów podnabłonkowych. W bardziej zaawansowanych przypadkach obraz podwójnej linii połączonej poprzecznymi wyczernionymi pasmami (szyny kolejowe, łańcuszek czy drabinka) będący wynikiem inkorporacji złogów w obręb błon podstawnych,
- brak znaczącej proliferacji komórek mezangialnych czy nabłonkowych,
- w zaawansowanych przypadkach obecność ognisk segmentalnej sklerotyzacji a także całkowicie sklerotycznie zmienionych kłębuszków,
- w obrazie ultrastrukturalnym różnej wielkości podnabłonkowe i śródbłonowe elektronowo-gęste złogi, pomiędzy którymi odkłada się materiał przypominający strukturę błony podstawnej (odpowiadający „kolcom” widocznym w preparatach impregnowanych solami srebra wg metody Jonesa), w późniejszej fazie zmian obecność znacznego, nieregularnego pogrubienia błon podstawnych [57, 106, 107].

W początkowej fazie nefropatii błoniastej kłębuszki w obrazie świetlno-mikroskopowym mogą mieć zachowaną prawidłową strukturę, we wszystkich badanych przeze mnie przypadkach zmiany były znacznie zaawansowane. U wszystkich chorych rozpoznano pierwotną glomerulopatię błoniastą.

Rozpoznanie zapalenia błoniasto-rozplemowego ustalono w oparciu o następujące kryteria:

- zwiększenie liczby komórek w obszarach mezangialnych wraz z proporcjonalnym wzrostem ilości macierzy (w bardziej zaawansowanych przypadkach także obraz sklerotyzacji kłębuszków) (fot. 7),
- nierównomierne, znaczne pogrubienie ścian włóśniczek kłębuszkowych,

czasem z obecnością leukocytów i monocytów w świetle włóśniczek,

- zaakcentowanie zrazikowej struktury kłębuszków (fot. 7),
- zmniejszenie przestrzeni podtorebkowej,
- zrosty pętli z torebką Bowmana, w tym także półksiężycowate,
- w preparatach impregnowanych solami srebra wg metody Jonesa obecność dwóch, a niekiedy nawet kilku, srebro-chłonnych warstw w sieci włóśniczek; pomiędzy nimi znajdowały się nieregularne łączące je „odgałęzienia”,
- widoczne w badaniu elektronowo-mikroskopowym przemieszczenie wypustek komórek mezangialnych na obwód pętli, znajdują się one między błoną podstawną a komórkami śródbłonkowymi, towarzyszy im macierz mezangialna. Obecność tej warstwy uwidacznia się w preparatach impregnowanych solami srebra jako podwójne okonturowanie ścian włóśniczek.
- obecność w badaniu ultrastrukturalnym złogów podśródbłonkowych oraz mezangialnych, a także pojedynczych złogów podnabłonkowych [106, 107].

Powyżej wymienione cechy pozwoliły na rozpoznanie typu I zapalenia błoniasto-rozplemowego. U wszystkich badanych chorych nie stwierdzono przyczyn wtórnych tej glomerulopatii i można było w związku z tym rozpoznać zapalenie błoniasto-rozplemowe pierwotne.

2. BADANIA MORFOMETRYCZNE

2.1. TWORZENIE I REJESTRACJA CYFROWYCH OBRAZÓW MIKROSKOPOWYCH

We wszystkich badanych przypadkach skrawki parafinowe zabarwiono czerwienią Syriusza. W metodzie tej uzyskuje się dwukolorowy obraz, gdzie włóknienie śródmiaższowe przybiera intensywnie czerwono-wiśniowy kolor, podczas gdy reszta punktu ma kolor żółty [56]. Oczywiście w warunkach prawidłowych pomiędzy cewkami w śródmiaższu także znajduje się nieco włókien kolagenowych, ale jest ich zawsze mniej więcej tyle samo, więc można tę ilość pominąć i uznać za zafałszowanie obecne w każdym przypadku. W ten sposób opracowane punkty poddano ocenie morfometrycznej.

Badania morfometryczne materiału świetlno-mikroskopowego wykonano zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej. We wszystkich przypadkach fotografowano (przy powiększeniu obiektywu x 40) za pomocą kamery firmy OLYMPUS (DP12) i zapisywano na dysku komputera obrazy całego biopsatu. Automatycznie ustawiano w programie kamery parametry jasności, kontrastu i nasycenia barw obrazu mikroskopowego. W każdym przypadku wykonywano kolejne zdjęcia punktu, aby znalazł się on w całości. Dla każdego punktu rejestrowano od 42 do 131 zdjęć (średnio około 60 zdjęć). Obrazy cyfrowe o wielkości 640x480 pikseli zapisywano w formacie JPG na twardym dysku komputera oraz archiwizowano w pamięci zewnętrznej. Przy użyciu programu Image J obrysowywano granice każdego kłębuszka wzdłuż torebki Bowmana i wycinano te fragmenty obrazu z badanego pola widzenia. Podobnie postępowano z dużymi i średniego kalibru naczyniami śródmiaższowymi, które znalazły się we fragmencie punktu przeznaczonym do badania w mikroskopie świetlnym.

2.2. ANALIZA MORFOMETRYCZNA PÓŁAUTOMATYCZNA NASILENIA WŁÓKNIENIA ŚRÓDMIĄSZOWEGO

W kolejnym etapie dokonywano przekształcenia obrazu kolorowego (składającego się z wielu odcieni koloru czerwono-wiśniowego i żółtego) na obraz zapisany w skali szarości, zastosowano także średni filtr w celu „wygładzenia” ziarnistości zdjęć. Następnie przeprowadzono segmentację polegającą na wyznaczeniu wartości progowych czyli wyznaczeniu przedziału wartości kolorów charakterystycznych dla badanego materiału (w moich badaniach – kolor czerwono-wiśniowy). W ten sposób obraz został podzielony na plan – obszar reakcji i tło – elementy nie podlegające analizie (w moich badaniach – cewki nerkowe). Efektem segmentacji był obraz binarny, czarno-biały, gdzie obiekty badane zostały wyodrębnione poprzez czarny kolor, natomiast pozostałe tło było białe. Na tej podstawie wyznaczono wielkość wyodrębnionych struktur i obliczono pole powierzchni reakcji na podstawie liczby pikseli odczytanych z histogramu. Mając wyznaczone pole reakcji oraz znając wielkość ocenianego obrazu wyliczono średni procentowy udział pola zajętego przez reakcję barwną (nasilenie włóknienia śródmiąższowego) dla każdego bioptatu (fot. 8, 9, 10, 11, 12).

2.3. ANALIZA MORFOMETRYCZNA AUTOMATYCZNA NASILENIA WŁÓKNIEŃ ŚRÓDMIĄSZOWEGO

Początkowe etapy przygotowania materiału do analizy morfometrycznej automatycznej były identyczne jak opisane w punkcie poprzednim (akwizycja i rejestracja zdjęć punktów oraz usunięcie fragmentów obrazu nie podlegających analizie). Dalsze badania przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania Nerka 1.0b. Zostało ono stworzone w Zakładzie Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej (kierowanym przez Prof. dr hab. Elżbietę Kaczmarek). Program oparto o zaimplementowany przez dr Łukasza Łapaja w środowisku Borland Delphi autorski algorytm segmentacji kolorowych obrazów mikroskopowych, który pozwala na wyodrębnienie na zdjęciach preparatów obszarów tła, mięszu nerki oraz obszarów włóknienia śródmiąższowego. Aplikacja została zaprojektowana pod kątem pracy z wysokiej rozdzielczości zdjęciami preparatów mikroskopowych barwionych czerwienią Syriusza. Wykorzystuje ona segmentację metodą progowania w przestrzeni barwnej RGB, w której każdy kolor opisany jest za pomocą trzech składowych (R – czerwieni, G – zieleni, B – błękitu). System RGB jest standardowym narzędziem do opisu obrazów barwnych w grafice komputerowej i w przypadku omawianej aplikacji pozwala na bardzo precyzyjne odwzorowanie barw w preparatach mikroskopowych.

W zastosowanej metodzie segmentacji kolor każdego piksela zdjęcia preparatu jest najpierw „rozbijany” na składowe R, G oraz B. Następnie zależnie od udziału tych składowych w barwie danego piksela, jest on klasyfikowany jako tło (w moim przypadku cewki nerkowe) bądź obszar włóknienia śródmiąższowego. Po przeprowadzeniu tej operacji dla każdego punktu obrazu program obliczał obszar zajmowany przez piksele zaklasyfikowane jako tło i włóknienie śródmiąższowe. Znajomość tych parametrów pozwalała precyzyjnie określić nasilenie włóknienia śródmiąższowego w danym zdjęciu (a następnie w całym bioptacie) i wyrazić go wartością liczbową (% włóknienia śródmiąższowego = obszar włóknienia

śródmiaższowego/obszar zajmowany przez cewki nerkowe + obszar włóknienia śródmiaższowego x 100%).

Program sam dobierał odpowiednie parametry segmentacji, bez ingerencji użytkownika. Na etapie przygotowania aplikacji algorytm analizy automatycznej zaprojektowano w ten sposób, by wyniki generowane przez program były możliwie zbliżone do rezultatów segmentacji manualnej prowadzonej przez patomorfologa. W tym celu podczas pisania programu parametry działania algorytmu automatycznego wyznaczono na podstawie analizy wyników manualnej segmentacji 200 obrazów przeprowadzonej przez wykwalifikowanego, doświadczonego patomorfologa. Tak zaprojektowany algorytm umożliwiał automatyczną, szybką i w pełni powtarzalną analizę obrazów mikroskopowych, generując wyniki porównywalne z rezultatem pracy patologa.

Omawiana aplikacja posiada szereg funkcji ułatwiających pracę z obrazami mikroskopowymi, przy czym do najważniejszych należy możliwość korekcji nierównomiernego oświetlenia preparatu oraz maskowania wybranych obszarów obrazu. Funkcja maskowania pozwala na interaktywne (za pomocą myszki) zaznaczenie obszarów obrazu, które będą wykluczone z analizy. Dzięki temu możliwe jest wyłączenie z analizy różnego rodzaju artefaktów.

3. OBSERWACJE KLINICZNE

Wyniki obserwacji klinicznych chorych z poszczególnymi glomerulopatiami (średni dobowy białkomocz, poziom kreatyniny, klirens kreatyniny) porównano z pomiarami nasilenia włóknienia śródmiąższowego dokonanymi metodą półautomatyczną i automatyczną. Wyodrębniono także z całej badanej grupy tych chorych, u których rozwinęła się schyłkowa niewydolność nerek i porównano z resztą pacjentów.

Dane kliniczne uzyskano z Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, w której stosuje się następujące definicje podanych niżej określeń:

- **ZN – zespół nerczycowy** – białkomocz przekraczający 3,5g/d z hipoproteinemią, hipoalbuminemią, hipercholesterolemią i towarzyszącymi obrzękami. W wynikach uwzględniono średni dobowy białkomocz, wartość tę uzyskano uśredniając wyniki trzech pomiarów.
- **Wykładniki aktywnego osadu moczu – krwinkomocz** – obecność więcej niż 2 krwinek czerwonych wyługowanych w polu widzenia, w oglądanym pod mikroskopem osadzie odwirowanego moczu.
- **↑RR – nadciśnienie tętnicze** – wartości przekraczające 140/90mmHg.
- **R – remisja** – określana na podstawie zmniejszenia białkomoczu poniżej 0,2g/d przy zachowanej prawidłowej funkcji nerek definiowanej jako stężenie kreatyniny w surowicy krwi $\leq 1,2\text{mg\%}$.
- **SNN – schyłkowa niewydolność nerek** – określana jako konieczność rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego.
- **PG – progresja choroby** – oceniana na podstawie podwojenia stężenia kreatyniny w surowicy krwi w ciągu roku.
- **BP – brak poprawy** – utrzymywanie się białkomoczu powyżej 2,0g/d.
- **PP – poprawa stanu klinicznego** – określana jako spadek białkomoczu, ale z utrzymywaniem się wartości w granicach 0,2-2,0g/d.

4. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW POMIARÓW MORFOMETRYCZNYCH I OBSERWACJI KLINICZNYCH

Analiza statystyczna dokonana została przez mgr Agnieszkę Górą (Zakład Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej). Odsetek włóknienia śródmiąższu ustalony przy pomocy analizy półautomatycznej i automatycznej porównywano w poszczególnych grupach glomerulopatii (diagnozowanych w mikroskopie świetlnym, elektronowym i fluorescencyjnym) oraz w grupie kontrolnej. Analiza statystyczna wykonana została za pomocą testów nieparametrycznych.

Do porównania metody półautomatycznej i automatycznej zastosowano test kolejności par Wilcozona. Dla porównania poszczególnych grup klinicznych oraz grupy kontrolnej z grupą badaną zastosowano test Manna-Whitney'a. Do wykazania zależności między nasileniem włóknienia śródmiąższowego badanym metodą półautomatyczną i automatyczną (AP, AA), a poszczególnymi parametrami klinicznymi (średni dobowy białkomocz, największa dobową utratą białka z moczem, poziom kreatyniny, klirens kreatyniny) wykorzystano współczynnik korelacji nieparametrycznej Spearmana. Wartości współczynnika korelacji weryfikowano testem istotności współczynnika korelacji oraz podziałem kategorialnym, wg którego współczynnik istotny statystycznie, lecz z przedziału od 0 do 0,5 lub od -0,5 do 0 uznano jako słabą lub bardzo słabą korelację [110].

Wszystkie wyniki analiz statystycznych przyjęto jako istotne statystycznie dla poziomu $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne wykonano przy pomocy programu Statistica Pl v.10.0. Dodatkowo wyniki zostały zilustrowane wykresami rozrzutu.

WYNIKI

1. WYNIKI BADAŃ MORFOLOGICZNYCH

W badanej grupie w oparciu o kryteria morfologiczne, zgodne z obowiązującymi klasyfikacjami, opisane w rozdziale „Materiał i metody” rozpoznano następujące glomerulopatie:

- u 22 chorych ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS). W grupie tej znalazło się 5 kobiet (w wieku od 25 do 41 lat, średni wiek 31,4 lat) i 17 mężczyzn (w wieku od 19 do 50 lat, średni wiek 36,88 lat);
- u 6 chorych nefropatię IgA, klasy IV (zmiany rozplemowe rozlane). W grupie tej byli wyłącznie mężczyźni (w wieku od 17 do 44 lat, średni wiek 31 lat);
- glomerulopatię błoniastą rozpoznano u 6 pacjentów. Grupa ta składała się z 2 kobiet (w wieku 36 i 66 lat, średni wiek 51 lat) i 4 mężczyzn (w wieku od 18 do 49 lat, średni wiek 35,25 lat);
- w 5 przypadkach rozpoznano zapalenie błoniasto-rozplemowe typu I. W grupie tej znaleźli się wyłącznie mężczyźni (w wieku od 44 do 65 lat, średni wiek 53,4 lat).

Szczegółowe dane dotyczące wieku, płci, liczby kłębuszków w biopsji oraz czasu obserwacji w poszczególnych grupach chorych przedstawione zostały w tabelach 1-4.

Tabela 1. Dane dotyczące wieku, płci, liczby kłębuszków w biopsji oraz czasu obserwacji w grupie chorych z rozpoznaniem ogniskowego segmentalnego stwardnienia kłębuszków nerkowych (FSGS).

nr badania	chory	wiek	płeć	liczba kłębuszków	obserwacja (w latach)
812227	B.Z.	44	M	11	20
824866	N.Ł.	46	M	12	20
850771	B.J.	36	M	15	19
877891	G.S.	50	M	11	14
969988	J.K.*	36 (37*)	M	15 (14*)	14
978417	K.H.	35	K	15	14
983313	Z.S.	40	M	11	13
986743	K.A.*	30 (30*)	M	14 (14*)	13
817753	G.J.	24	M	14	20
993006	K.K.	46	M	14	13
802118	N.J.	44	M	13	21
1008658	P.H.	25	K	11	19
982094	Ś.W.*	27 (28*)	K	13 (14*)	14
775117	T. J.	22	M	10	22
822395	D.W.	38	M	18	20
846449	S.H.	41	K	10	19
853493	S.J.	44	M	14	19
979143	K.M.*	46 (47*)	M	10 (14*)	14
763986	C.W.	31	M	13	22
819175	K.R.*	19 (26*)	M	12 (14*)	20
1002649	Ł.I.	28	K	15	13
776402	M.Z.	31	M	15	22

* oznaczono chorych, u których wykonano rebiopsję;

Tabela 2. Dane dotyczące wieku, płci, liczby kłębuszków w biopsji oraz czasu obserwacji w grupie chorych z rozpoznaniem nefropatii IgA.

nr badania	chory	wiek	płeć	liczba kłębuszków	obserwacja (w latach)
997317	S.W.	31	M	11	14
981464	J.P.	25	M	10	14
1006509	M.M.	36	M	16	13
979388	R.J.	33	M	28	14
1011445	T.A.	14	M	14	12
1013576	Z.K.	17	M	12	12

Tabela 3. Dane dotyczące wieku, płci, liczby kłębuszków w biopsji oraz czasu obserwacji w grupie chorych z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej.

nr badania	chory	wiek	płeć	liczba kłębuszków	obserwacja (w latach)
1022370	H.M.	36	K	14	12
1007752	K.K.	43	M	18	13
983237	W.G.	31	M	17	14
987215	L.G.	66	K	16	13
999999	M.T.	18	M	10	13
985411	M.Ł.	49	M	14	14

Tabela 4. Dane dotyczące wieku, płci, liczby kłębuszków w biopsji oraz czasu obserwacji w grupie chorych z rozpoznaniem zapalenia błoniasto-rozplelowego.

nr badania	chory	wiek	płeć	liczba kłębuszków	obserwacja (w latach)
997457	L.B.*	44 (48*)	M	14 (14*)	13
1016202	N.R.*	56 (57*)	M	10 (11*)	12
967556	Ł.P.	48	M	14	14
1026149	K.W.	65	M	19	12
1095120	Z.C.	54	M	21	10

* oznaczono chorych, u których wykonano rebiopsję;

W badaniu świetlno-mikroskopowym we wszystkich przypadkach biopsja obejmowała co najmniej 10 kłębuszków. Największa liczba w dwóch biopsjach wyniosła 28 kłębuszków (średnio 14,21 kłębuszków).

2. WYNIKI BADANIA IMMUNOFLUORESCENCYJNEGO

Badanie immunofluorescencyjne (IF) przeprowadzono w 37 przypadkach (w 2 przypadkach nie było kłębuszków w części punktu przeznaczonej do badania w mikroskopie fluorescencyjnym).

Szczegółowe wyniki badania IF uwzględniające zarówno lokalizację, jak i typ złogów zestawiono w tabelach 5-8 (w poszczególnych grupach glomerulopatii).

Tabela 5. Zestawienie wyników badania immunofluorescencyjnego w grupie chorych z rozpoznaniem ogniskowego segmentalnego stwardnienia kłębuszków nerkowych (FSGS).

typ złogów immunokompleksów	lokalizacja złogów	N
IgM, C3	mezangialna	4
IgM, IgA, C3	mezangialna	5
IgM, C3, C1q	mezangialna	2
IgM, C3, C1q, C4	mezangialna	2
IgM, IgG, C3, C1q	mezangialna	2
IgM, IgA, C3, C1q	mezangialna	3
IgM, IgA, C3, C1q, C4	mieszana (mezangialna i nacyniowa)	2

N – liczba pacjentów

Tabela 6. Zestawienie wyników badania immunofluorescencyjnego w grupie chorych z nefropatią IgA.

typ złogów immunokompleksów	lokalizacja złogów	N
IgA, IgM, C3	mezangialna	2
IgA, IgM, C3, C1q	mezangialna	2
IgA, IgM	mezangialna	1
IgA, C3	mezangialna	1

N – liczba pacjentów

Tabela 7. Zestawienie wyników badania immunofluorescencyjnego w grupie chorych z glomerulopatią błoniastą.

typ złogów immunokompleksów	lokalizacja złogów	N
IgG, C3	naczyniowa	3
IgG, IgM, C3	naczyniowa	1
IgG, IgM, C3, C1q	naczyniowa	2

N – liczba pacjentów

Tabela 8. Zestawienie wyników badania immunofluorescencyjnego w grupie chorych z zapaleniem błoniasto-rozplemowym.

typ złogów immunokompleksów	lokalizacja złogów	N
IgG, IgA, IgM, C3	mieszana (mezangialna i naczyniowa)	3
IgG, IgM, C3	mieszana (mezangialna i naczyniowa)	2

N – liczba pacjentów

3. BADANIA MORFOMETRYCZNE ŚWIETLNO-MIKROSKOPOWE

We wszystkich badanych przypadkach wykonano badania morfometryczne świetlno-mikroskopowe. Miały one na celu pomiary pola powierzchni włóknienia w stosunku do całej powierzchni biopsatu (po graficznym usunięciu kłębuszków oraz średniej wielkości i dużych naczyń śródmiąższowych). Pomiarów dokonano dwiema metodami: półautomatyczną (za pomocą programu ImageJ) i automatyczną (przy udziale autorskiego programu Nerka 1.0b.), szczegółowy opis znajduje się w rozdziale „Materiał i metody”. Wyniki pomiarów morfometrycznych nasilenia włóknienia śródmiąższowego w poszczególnych grupach nefropatii umieszczono w tabelach 9-12.

Tabela 9. Wartości procentowe pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiaższowego u chorych z FSGS.

nr badania	chory	AP (%)	AA (%)
812227	B.Z.	24	25
824866	N.Ł.	34	33
850771	B.J.	37	37
877891	G.S.	31	31
969988	J.K.*	37 (37*)	35 (36*)
978417	K.H.	34	33
983313	Z.S.	35	36
986743	K.A.*	36 (35*)	35 (35*)
817753	G.J.	38	39
993006	K.K.	21	22
802118	N.J.	39	39
1008658	P.H.	36	36
982094	Ś.W.*	25 (25*)	26 (26*)
775117	T. J.	35	36
822395	D.W.	27	28
846449	S.H.	31	32
853493	S.J.	34	36
979143	K.M.*	33 (34*)	34 (35*)
763986	C.W.	35	34
819175	K.R.*	34 (38*)	33 (39*)
1002649	Ł.I.	37	38
776402	M.Z.	33	34

* oznaczono chorych, u których wykonano rebiopsję; AP – analiza półautomatyczna,
AA – analiza automatyczna

Tabela 10. Wartości procentowe pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego u chorych z rozpoznaniem nefropatii IgA.

nr badania	chory	AP (%)	AA (%)
997317	S.W.	31	32
981464	J.P.	32	32
1006509	M.M.	15	13
979388	R.J.	23	24
1011445	T.A.	21	22
1013576	Z.K.	24	25

AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna

Tabela 11. Wartości procentowe pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego u chorych z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej.

nr badania	chory	AP(%)	AA(%)
1022370	H.M.	31	32
1007752	K.K.	32	33
983237	W.G.	37	37
987215	L.G.	28	29
999999	M.T.	27	28
985411	M.Ł.	29	29

AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna

Tabela 12. Wartości procentowe pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego u chorych z zapaleniem błoniasto-rozplemowym.

nr badania	chory	AP (%)	AA (%)
997457	L.B.*	33 (36*)	34 (36*)
1016202	N.R.*	34 (36*)	34 (35*)
967556	Ł.P.	18	17
1026149	K.W.	31	31
1095120	Z.C.	37	38

* oznaczono chorych, u których wykonano rebiopsję;

AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna

W całej badanej grupie (łącznie z rebiopsjami, 46 bioptatów) średnia wartość nasilenia włóknienia śródmiąższowego uzyskana w analizie półautomatycznej wyniosła $31,52 \pm 5,78\%$ (wartości od 15 do 39%). Po przeprowadzeniu analizy automatycznej średnia wartość wyniosła $31,83 \pm 5,78\%$ (wartości od 13 do 39%). Porównanie wyników uzyskanych przy użyciu obydwu metod wykazało, że nie ma istotnej różnicy między analizą półautomatyczną a automatyczną ($p=0,06$).

W grupie FSGS odsetek włóknienia w analizie półautomatycznej wynosił od 21 do 39, średnio $33,15 \pm 4,75\%$, natomiast po zastosowaniu analizy automatycznej wartości procentowe wahały się od 22 do 39%, średnio $33,44 \pm 4,48\%$ (fot. 11). Wartości uzyskane w grupie FSGS porównano z odsetkiem włóknienia w pozostałych badanych grupach. Nie było istotnych statystycznie różnic z wyjątkiem grupy nefropatii IgA ($p<0,001$) oraz grupy kontrolnej ($p<0,001$), w których ujawniono niższe wartości.

W grupie nefropatii IgA analizowanej półautomatycznie odsetek pola powierzchni zajętego przez włóknienie śródmiąższowe wynosił od 15 do 32 %, średnio $24,33 \pm 6,38\%$. W analizie automatycznej wartości te wynosiły odpowiednio od 13 do 32%, średnio $24,67 \pm 7,09\%$ (fot. 9).

U chorych z nefropatią błoniastą wyniki uzyskane w analizie pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiaższowego wyniosły od 27 do 37%, średnio $30,67 \pm 3,61\%$. W analizie automatycznej wartości te wyniosły odpowiednio od 28 do 37%, średnio $31,33 \pm 3,39\%$ (fot. 10).

Analiza półautomatyczna przeprowadzona u chorych z zapaleniem błoniasto-rozplemowym ujawniła odsetek pola powierzchni zajętego przez włóknienia wynoszący od 18 do 37%, średnio $31,50 \pm 6,95\%$. Natomiast w analizie automatycznej wartości te wyniosły odpowiednio od 17 do 38%, średnio $31,50 \pm 7,45\%$. Porównano uzyskane w obu analizach wartości pola powierzchni zajętego przez włóknienie śródmiaższowe pomiędzy poszczególnymi grupami chorych nie znajdując istotnych statystycznie różnic (z wyjątkiem wyżej wymienionych grup FSGS i nefropatii IgA).

W 7 przypadkach wykonano rebiopsję: u 5 chorych z rozpoznaniem FSGS oraz u 2 chorych z rozpoznaniem zapalenia błoniasto-rozplemowego. We wszystkich tych przypadkach w powtórnych biopsjach także dokonano analizy morfometrycznej włóknienia śródmiaższowego. W związku z tym ogólna liczba bioptatów, w których wykonano pomiary pola powierzchni włóknienia śródmiaższowego wyniosła 46. Rebiopsje wykonane zostały w stosunkowo krótkim czasie po wykonaniu pierwszej biopsji. U chorych z grupy FSGS czas ten wynosił średnio 16,8 miesięcy, w 4 przypadkach wahał się od 6 do 10 miesięcy, u tych chorych nasilenie włóknienia śródmiaższowego wzrosło nieznacznie – najwięcej o 1% (tabela 9). U jednego chorego (KR) rebiopsję wykonano po 7 latach od pierwszej biopsji, a wartość włóknienia śródmiaższowego wzrosła o około 5% przy użyciu obu metod analizy obrazu (tabela 9). U jednego chorego z zapaleniem błoniasto-rozplemowym rebiopsję wykonano po 11 miesiącach, a u drugiego po 46 miesiącach. W obu przypadkach nasilenie włóknienia śródmiaższowego także zmieniło się nieznacznie (1-3%) (tabela 12).

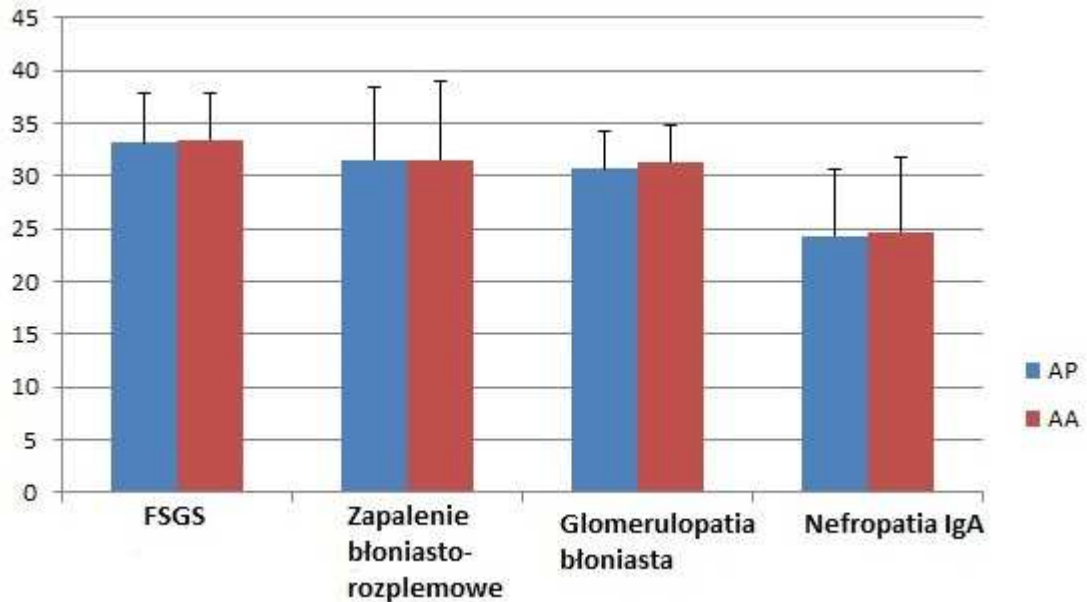
W tabeli 13 podano wartości najniższe, najwyższe i średnie (wraz z odchyleniem standardowym) nasilenia włóknienia śródmiaższowego w różnych grupach glomerulopatii dla obu metod pomiarów. Ilustruje to także rycina 1.

Tabela 13. Wyniki pomiarów włóknienia śródmiąższowego (w %): najniższe, najwyższe i średnie (wraz z odchyleniem standardowym) uzyskane w analizie półautomatycznej i automatycznej u chorych z różnymi glomerulopatiami.

FSGS	N	min	max	średnia±SD
AP	27	21	39	33,15±4,75
AA	27	22	39	33,44±4,48
N IgA	N	min	max	średnia±SD
AP	6	15	32	24,33±6,38
AA	6	13	32	24,67±7,09
M	N	min	max	średnia±SD
AP	6	27	37	30,67±3,61
AA	6	28	37	31,33±3,39
M-P	N	min	max	średnia±SD
AP	7	18	37	31,50±6,95
AA	7	17	38	31,50±7,45

FSGS – ogniskowe, segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych, N IgA – nefropatia IgA, M – glomerulopatia błoniasta, M-P – zapalenie błoniasto-rozplamowe, N – liczba chorych, AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna, min – najniższa wartość włóknienia śródmiąższowego, max – najwyższa wartość włóknienia śródmiąższowego, średnia±SD – średni odsetek włóknienia wraz z odchyleniem standardowym.

Rycina 1. Wykres ilustruje średnie wartości nasilenia włóknienia śródmiąższowego w różnych typach glomerulopatii, analizowane metodą półautomatyczną (AP) i automatyczną (AA).



Badania morfometryczne świetlno-mikroskopowe wykonano także w 20 przypadkach z grupy kontrolnej (fragmenty części korowej nerek bez zmian patologicznych, nerki usunięto z powodu urazów komunikacyjnych). W grupie kontrolnej wiek wahał się od 15 do 59 lat, średnio 36,8 lat. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic odnośnie wieku ($p=0,583$). Wyniki pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego dokonane obiema metodami przedstawiono w tabeli 14 i 15.

Tabela 14. Wyniki pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego w stosunku do powierzchni całego biopsatu w grupie kontrolnej w analizie półautomatycznej i automatycznej (w %).

chory	AP (%)	AA (%)
M.S.	7	8
K.M.	9	9
P.O.	6	5
D.J.	12	13
K.O.	10	9
S.W.	9	8
D.W.	12	13
K.R.	16	16
M.Ż.	7	8
M.H.	8	9
A.R.	8	9
K.B.	11	11
M.R.	10	9
E.R.	14	15
U.K.	12	13
B.S.	6	5
J.S.	9	8
M.G.	7	9
I.J.	11	12
K.S.	12	13

AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna

Średnia wartość nasilenia włóknienia śródmiąższowego uzyskana w analizie półautomatycznej wyniosła $10,10 \pm 3,02\%$ (od 6 do 16%). Po przeprowadzeniu analizy automatycznej średnia wartość to $9,80 \pm 2,71\%$ (wartości od 5 do 16%).

Analiza statystyczna ujawniła istotne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolną ($p < 0,001$) oraz pomiędzy różnymi glomerulopatiami a grupą kontrolną ($p < 0,001$) (rycina 2).

Rycina 2. Wykres ilustruje różnice między całą grupą badaną a grupą kontrolną w nasileniu włóknienia śródmiąższowego analizowanego metodą półautomatyczną (AP) i automatyczną (AA).

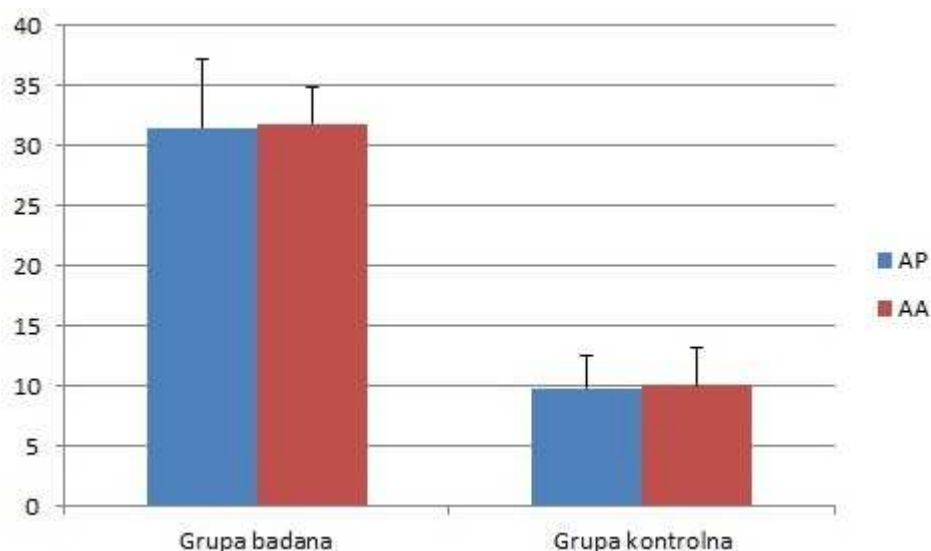


Tabela 15. Wartości najniższe, najwyższe i średnie wraz z odchyleniem standardowym uzyskane w analizie półautomatycznej i automatycznej w grupie kontrolnej.

grupa kontrolna	N	min	max	śr±SD
AP	20	6	16	10,10±3,02
AA	20	5	16	9,80±2,71

N – liczba chorych, AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna, min – najniższa wartość włóknienia śródmiąższowego, max – najwyższa wartość włóknienia śródmiąższowego, średnia±SD – średni odsetek włóknienia wraz z odchyleniem standardowym.

4. OBSERWACJE KLINICZNE

Podstawowym kryterium doboru badanej grupy była możliwość uzyskania dokładnych danych klinicznych, a także długi czas obserwacji umożliwiający ocenę ostatecznego przebiegu choroby, dlatego biopsje pochodziły z lat 1991-2003. Grupa chorych liczyła 39 przypadków. W czasie wykonania pierwszej biopsji wiek wynosił od 19 do 66 lat (średnio 38,66 lat). W 7 przypadkach wykonano rebiopsję. U 17 chorych wystąpienie objawów nerkowych było poprzedzone infekcjami (najczęściej były to infekcje górnych dróg oddechowych i infekcje dróg moczowych). Dane kliniczne odnośnie początkowych objawów nerkowych przedstawiono w tabeli 16.

Tab. 16. Początkowe objawy nerkowe u chorych w poszczególnych grupach glomerulopatii.

	B+E	B+NT	ZN	ZN+E	ZN+NT	ZN+NT+E	B+E+NT
FSGS	1	1	2	2	7	9	
N IgA	3			1		1	1
M			1	1	2	1	1
M-P					3	2	

ZN – zespół nerczycowy, E – krwinkomocz, NT – nadciśnienie tętnicze, B – białkomocz, FSGS – ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych, N IgA – nefropatia IgA, M – glomerulopatia błoniasta, M-P – zapalenie błoniasto-rozplemowe.

Do najczęstszych początkowych objawów nerkowych należał zespół nerczycowy. Wystąpił on u 32 chorych (u 20 chorych z FSGS, w 2 przypadkach nefropatii IgA, u 5 chorych z glomerulopatią błoniastą oraz w 5 przypadkach zapalenia błoniasto-rozplemowego). U 17 chorych zespołowi nerczycowemu towarzyszył krwinkomocz, a w 25 przypadkach obecne było także nadciśnienie tętnicze. Białkomocz wystąpił u 7 chorych (2 chorych z FSGS, 4 z nefropatią IgA oraz 1 z glomerulopatią błoniastą). W 6 przypadkach białkomoczowi towarzyszył krwinkomocz (1 chory z FSGS, 4 z nefropatią IgA

oraz 1 z glomerulopatią błoniastą), a w kolejnych 3 nadciśnienie tętnicze (1 chory z FSGS, 1 z nefropatią IgA oraz 1 z glomerulopatią błoniastą). U większości chorych (19/22 z FSGS, 3/6 z nefropatią IgA, 6/6 z glomerulopatią błoniastą oraz 4/5 z zapaleniem błoniasto-rozplemowym) wyjściowe stężenie kreatyniny w dniu wykonania biopsji wynosiło powyżej 1,2 mg%.

W kolejnych tabelach przedstawione zostały poziomy średniego dobowego białkomoczu, kreatyniny oraz klirensu kreatyniny w czasie pierwszej biopsji w poszczególnych grupach glomerulopatii (tabele 17-20), natomiast zależności między parametrami klinicznymi a nasileniem włóknienia śródmiąższowego w całej badanej grupie ilustrują ryciny 3-8.

Tabela 17. Średnia dobową utratą białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi oraz klirens kreatyniny u chorych z FSGS w czasie biopsji.

nr badania	chory	Uprot (średnia)	Pcr	Ccr
812227	B.Z.	3,80	1,4	110,40
824866	N.Ł.	4,50	1,7	70,50
850771	B.J.	4,80	1,9	41,25
877891	G.S.	4,10	2,0	75,24
969988	J.K.	4,90	2,1	50,00
978417	K.H.	4,40	1,8	69,58
983313	Z.S.	5,10	1,9	55,21
986743	K.A.	4,90	1,9	64,09
817753	G.J.	5,40	2,5	48,05
993006	K.K.	3,40	0,9	98,30
802118	N.J.	6,10	2,9	56,87
1008658	P.H.	5,30	1,3	65,19
982094	Ś.W.	3,90	1,2	96,72
775117	T. J.	5,10	2,1	54,10
822395	D.W.	3,80	1,1	85,50
846449	S.H.	4,10	1,6	91,30
853493	S.J.	4,10	1,3	59,00
979143	K.M.	4,10	1,8	97,70
763986	C.W.	4,30	1,9	70,50
819175	K.R.	4,60	1,9	60,50
1002649	Ł.I.	5,00	2,7	40,90
776402	M.Z.	4,70	1,8	58,50

Uprot (średnia) – średni białkomocz dobowy (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min);

Tabela 18. Średnia dobową utratą białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi oraz klirens kreatyniny u chorych z nefropatią IgA w czasie biopsji.

nr badania	chory	Uprot (średnia)	Pcr	Ccr
997317	S.W.	4,20	1,7	90,00
981464	J.P.	2,40	1,6	88,90
1006509	M.M.	2,70	0,9	115,00
979388	R.J.	3,20	1,3	102,80
1011445	T.A.	2,90	1,2	123,80
1013576	Z.K.	2,70	1,1	108,30

Uprot (średnia) – średni białkomocz dobowy (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min);

Tabela 19. Średnia dobową utratą białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi oraz klirens kreatyniny u chorych z glomerulopatią błoniastą w czasie biopsji.

nr badania	chory	Uprot (średnia)	Pcr	Ccr
1022370	H.M.	4,40	2,4	72,80
1007752	K.K.	4,10	1,7	71,43
983237	W.G.	5,30	2,3	47,90
987215	L.G.	3,80	1,5	82,40
999999	M.T.	3,70	1,3	95,23
985411	M.Ł.	3,90	1,4	91,80

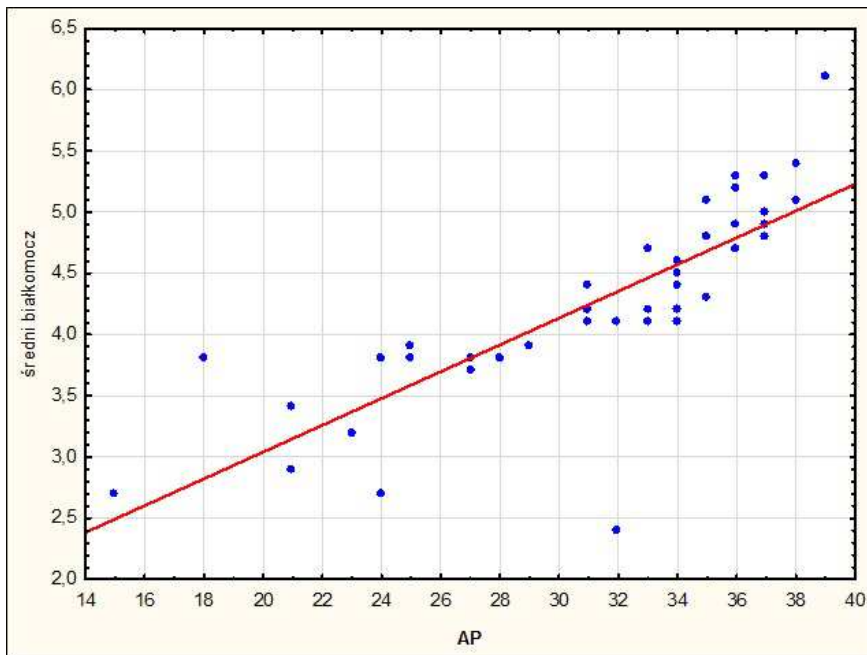
Uprot (średnia) – średni białkomocz dobowy (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min);

Tabela 20. Średnia dobową utratą białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi oraz klirens kreatyniny u chorych z zapaleniem błoniasto-rozplelowym w czasie biopsji.

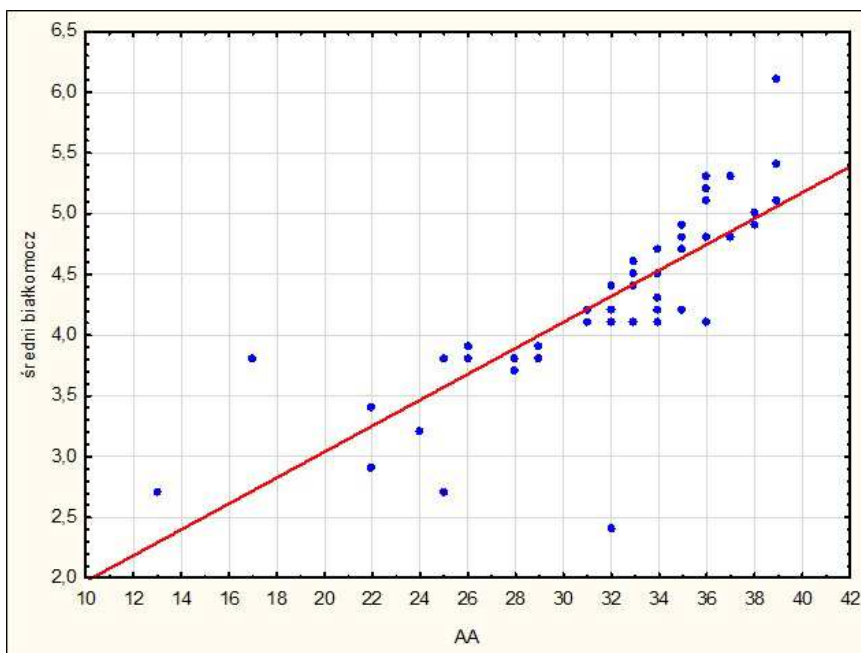
nr badania	chory	Uprot (średnia)	Pcr	Ccr
997457	L.B.	4,20	1,8	75,02
1016202	N.R.	4,50	1,3	68,03
967556	Ł.P.	3,80	0,9	105,60
1026149	K.W.	4,20	1,7	77,06
1095120	Z.C.	4,90	2,2	53,90

Uprot (średnia) – średni białkomocz dobowy (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min);

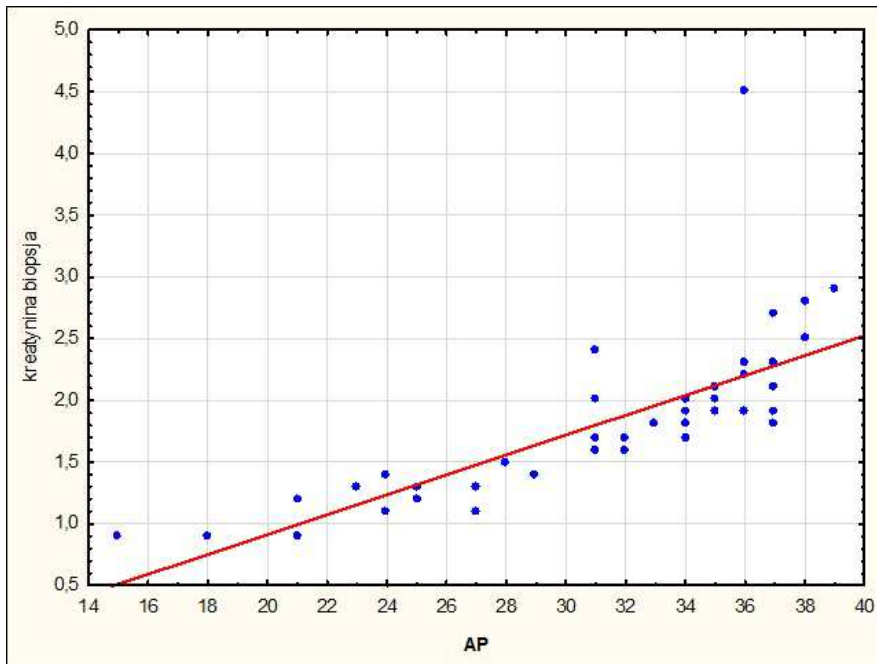
Rycina 3. Wykres ilustruje zależność między średnim dobowym białkomoczem a nasileniem włóknienia śródmiąższowego, analizowanego metodą półautomatyczną (AP), w całej badanej grupie.



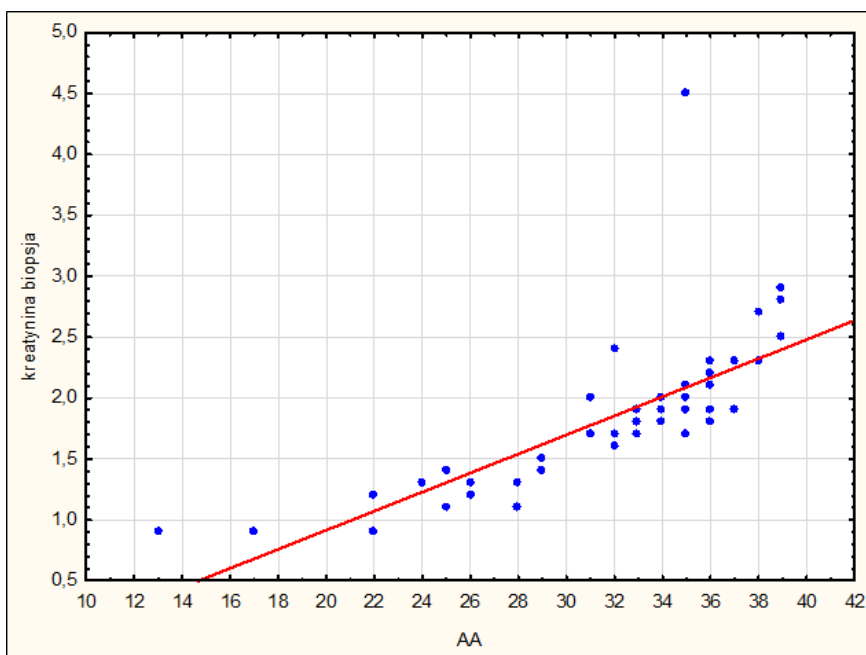
Rycina 4. Wykres ilustruje zależność między średnim dobowym białkomoczem a nasileniem włóknienia śródmiąższowego, analizowanego metodą automatyczną (AA), w całej badanej grupie.



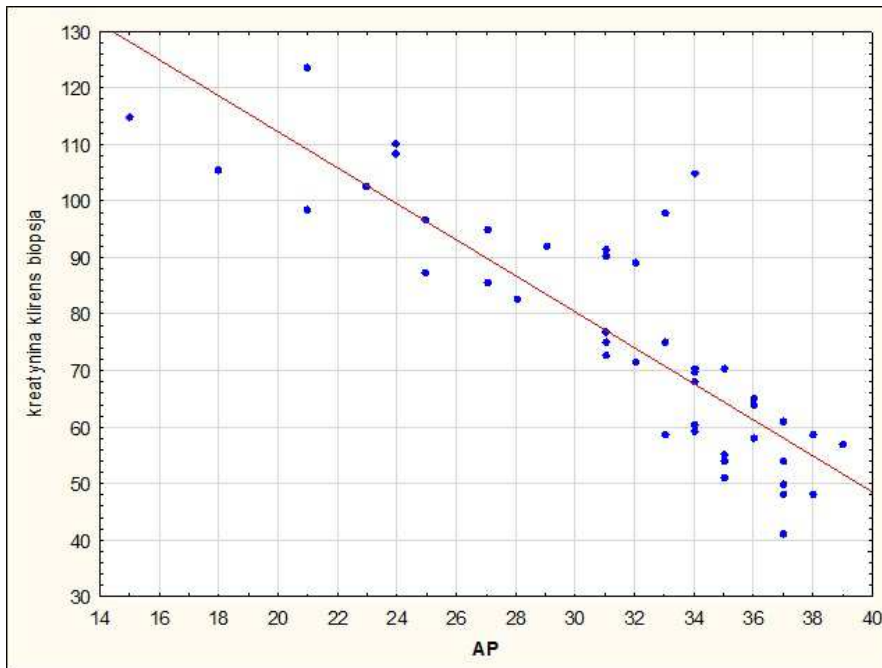
Rycina 5. Wykres ilustruje zależność między stężeniem kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego, analizowanego metodą półautomatyczną (AP), w całej badanej grupie.



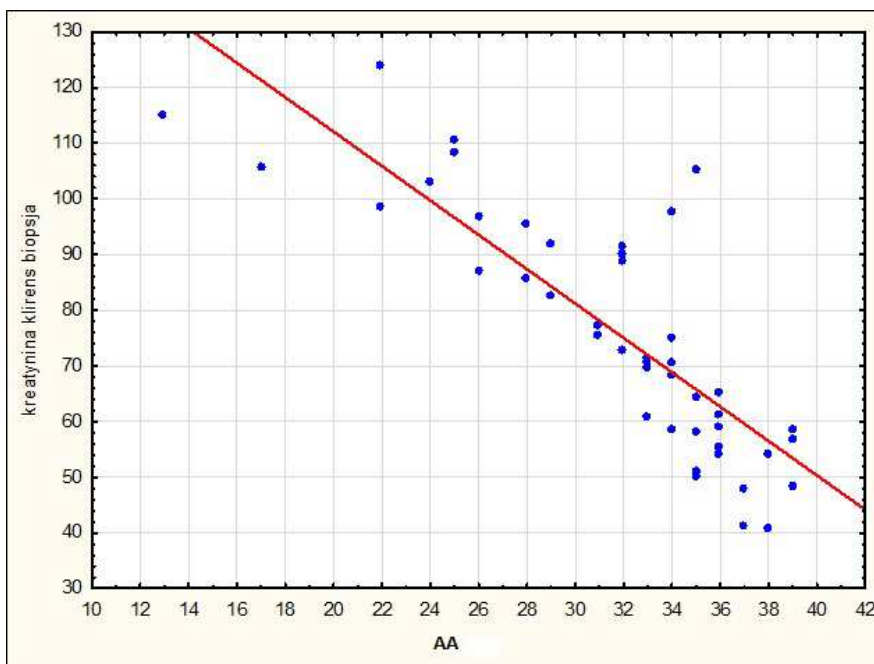
Rycina 6. Wykres ilustruje zależność między stężeniem kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego, analizowanego metodą automatyczną (AA), w całej badanej grupie.



Rycina 7. Wykres ilustruje zależność między klirensem kreatyniny (ml/min) a nasileniem włókienia śródmiąższowego, analizowanego metodą półautomatyczną (AP), w całej badanej grupie.



Rycina 8. Wykres ilustruje zależność między klirensem kreatyniny (ml/min) a nasileniem włókienia śródmiąższowego, analizowanego metodą automatyczną (AA), w całej badanej grupie.



U 7 chorych bez początkowych objawów ZN zastosowano leczenie objawowe. U wszystkich chorych z objawami ZN włączono leczenie glukokortykosteroidami, początkowo w postaci pulsów Metyloprednizolonu, następnie Prednizolon (w dawce 1mg/kg) przez 4-6 tygodni, ze stopniowym zmniejszaniem dawki do dawki podtrzymującej. W tej grupie u części chorych zastosowano także leczenie immunosupresyjne (Chlorambucilem, Cyklofosfamidem czy Azatiopryną), włączono je u 17/22 pacjentów z FSGS, u 1/6 z nefropatią IgA, u 4/6 z glomerulopatią błoniastą i u 4/6 z zapaleniem błoniasto-rozplemowym. Dane kliniczne dotyczące obserwacji chorych po 2 latach i ostateczny efekt przebiegu choroby po 10 latach przedstawiono w kolejnych tabelach (tabele 21-24). Po 2 latach leczenia u 9 chorych udało się osiągnąć remisję (4/22 chorych z FSGS, 4/6 z nefropatią IgA oraz 1/6 z glomerulopatią błoniastą). Poprawę stanu klinicznego (dobowa utrata białka z moczem w granicach 0,2-2,0g/d) uzyskano u 17 chorych (u 10/22 z FSGS, u 2/6 z nefropatią IgA, u 3/6 z glomerulopatią błoniastą i u 2/5 z zapaleniem błoniasto-rozplemowym). U 9 chorych nie udało się, mimo leczenia, osiągnąć poprawy stanu klinicznego (6/22 chorych z FSGS, u 2/6 z glomerulopatią błoniastą oraz 1/5 z zapaleniem błoniasto-rozplemowym), a u dalszych 4 chorych (2/22 z FSGS i 2/6 z zapaleniem błoniasto-rozplemowym) doszło do progresji choroby.

Rezultaty leczenia i naturalnego przebiegu choroby okazały się znacznie gorsze po 10 latach obserwacji. U 26 chorych doszło do rozwoju schyłkowej niewydolności nerek wymagającej hemodializowania i/lub przeszczepienia nerki (17/22 chorych z FSGS, 2/6 z nefropatią IgA, 3/6 z glomerulopatią błoniastą oraz 4/5 z zapaleniem błoniasto-rozplemowym). U 3 chorych doszło do progresji choroby, chociaż nie rozwinęły się jeszcze objawy schyłkowej niewydolności nerek (2/22 chorych z FSGS, 1/6 chorych z glomerulopatią błoniastą). U 3 chorych odnotowano poprawę stanu klinicznego, chociaż nadal utrzymywał się białkomocz powyżej 0,2 g/d (1/6 chorych z nefropatią IgA oraz 2/6 z glomerulopatią błoniastą). Całkowitą remisję po 10 latach obserwacji

udało się osiągnąć u 7 chorych (3/22 chorych z FSGS, 3/6 z nefropatią IgA oraz 1/5 z zapaleniem błoniasto-rozplamowym).

Tabela 21. Największa dobową utratę białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi, klirens kreatyniny, efekt leczenia po 2 latach obserwacji oraz końcowy efekt obserwacji (po 10 latach) u chorych z FSGS.

nr badania	chory	Uprot	Pcr	Ccr	efekt leczenia po 2 latach	efekt leczenia po 10 latach
812227	B.Z.	0,12	0,9	125,00	R	PG
824866	N.Ł.	2,40	1,3	90,00	BP	SNN
850771	B.J.	3,70	1,4	79,65	BP	SNN
877891	G.S.	0,34	1,1	98,10	PP	SNN
969988	J.K.	1,70	1,5	81,20	PP	SNN
978417	K.H.	1,60	1,3	91,00	PP	PG
983313	Z.S.	4,80	1,4	84,90	BP	SNN
986743	K.A.	1,70	1,4	83,20	PP	SNN
817753	G.J.	1,80	1,6	78,60	PP	SNN
993006	K.K.	0	0,8	200,00	R	R
802118	N.J.	1,27	1,7	81,40	PP	SNN
1008658	P.H.	4,50	3,0	58,60	PG	SNN
982094	Ś.W.	0,18	0,7	187,50	R	R
775117	T. J.	0,70	1,6	31,90	PP	SNN
822395	D.W.	0,18	1,0	103,00	R	R
846449	S.H.	0,40	1,3	72,00	PP	SNN
853493	S.J.	8,30	2,6	25,00	PG	SNN
979143	K.M.	6,40	1,3	91,25	BP	SNN
763986	C.W.	2,40	1,3	92,00	BP	SNN
819175	K.R.	1,60	1,6	75,00	PP	SNN
1002649	Ł.I.	2,30	1,7	66,23	BP	SNN
776402	M.Z.	1,30	1,3	98,50	PP	SNN

Uprot – najwyższy dobowy białkomocz (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min), R – całkowita remisja (dobowa utrata białka z moczem poniżej 0,2 g/d), PP – poprawa stanu chorego (dobowa utrata białka z moczem w granicach 0,2-2,0g/d), BP – brak poprawy, PG – progresja objawów nerkowych, SNN – schyłkowa niewydolność nerek.

Tabela 22. Największa dobowa utrata białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi, klirens kreatyniny, efekt leczenia po 2 latach obserwacji oraz końcowy efekt obserwacji (po 10 latach) u chorych z nefropatią IgA.

nr badania	chory	Uprot	Pcr	Ccr	efekt leczenia po 2 latach	efekt leczenia po 10 latach
997317	S.W.	0	1,3	195,00	R	SNN
981464	J.P.	0,17	1,2	92,60	R	SNN
1006509	M.M.	0,18	0,8	135,00	R	R
979388	R.J.	1,00	0,8	119,50	PP	PP
1011445	T.A.	0,70	0,9	118,60	PP	R
1013576	Z.K.	0,19	0,8	128,50	R	R

Uprot – najwyższy dobowy białkomocz (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min), R – całkowita remisja (dobowa utrata białka z moczem poniżej 0,2 g/d), PP – poprawa stanu chorego (dobowa utrata białka z moczem w granicach 0,2-2,0g/d), SNN – schyłkowa niewydolność nerek.

Tabela 23. Największa dobowa utrata białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi, klirens kreatyniny, efekt leczenia po 2 latach obserwacji oraz końcowy efekt obserwacji (po 10 latach) u chorych z glomerulopatią błoniastą.

nr badania	chory	Uprot	Pcr	Ccr	efekt leczenia po 2 latach	efekt leczenia po 10 latach
1022370	H.M.	4,30	1,2	97,20	BP	SNN
1007752	K.K.	0,58	1,0	108,00	PP	SNN
983237	W.G.	0,12	1,7	83,50	R	SNN
987215	L.G.	1,08	0,9	101,20	PP	PG
999999	M.T.	2,50	0,9	118,50	BP	PP
985411	M.Ł.	1,68	1,0	122,00	PP	PP

Uprot – najwyższy dobowy białkomocz (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min), R – całkowita remisja (dobowa utrata białka z moczem poniżej 0,2 g/d), PP – poprawa stanu chorego (dobowa utrata białka z moczem w granicach 0,2-2,0g/d), BP – brak poprawy, PG – progresja objawów nerkowych, SNN – schyłkowa niewydolność nerek.

Tabela 24. Największa dobowa utrata białka z moczem, stężenie kreatyniny w surowicy krwi, klirens kreatyniny, efekt leczenia po 2 latach obserwacji oraz końcowy efekt obserwacji (po 10 latach) u chorych z zapaleniem błoniasto-rozplelowym.

nr badania	chory	Uprot	Pcr	Ccr	efekt leczenia po 2 latach	efekt leczenia po 10 latach
997457	L.B.	7,40	1,5	91,52	BP	SNN
1016202	N.R.	6,20	2,6	81,20	PG	SNN
967556	Ł.P.	0,50	0,7	119,00	PP	R
1026149	K.W.	1,07	1,2	96,70	PP	SNN
1095120	Z.C.	8,60	4,4	35,00	PG	SNN

Uprot – najwyższy dobowy białkomocz (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min), R – całkowita remisja (dobowa utrata białka z moczem poniżej 0,2 g/d), PP – poprawa stanu chorego (dobowa utrata białka z moczem w granicach 0,2-2,0g/d), BP – brak poprawy, PG – progresja objawów nerkowych, SNN – schyłkowa niewydolność nerek.

W całej badanej grupie porównano wyniki pomiarów morfometrycznych pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego dokonane metodą analizy półautomatycznej i automatycznej z wartościami średniej dobowej utraty białka w czasie biopsji, ze stężeniem kreatyniny w surowicy krwi oraz klirensem kreatyniny. Zarówno w analizie półautomatycznej, jak i automatycznej uzyskano silną zależność pomiędzy nasileniem włóknienia a średnią dobową utratą białka z moczem, stężeniem kreatyniny w surowicy krwi oraz klirensem kreatyniny.

Grupa badana liczyła 46 bioptatów, ponieważ u 7 chorych wykonano rebiopsję. Nasilenie włóknienia śródmiąższowego oceniono zarówno w pierwszej biopsji, jak i w materiale pochodzącym z rebiopsji. Do grupy badanej włączono także odpowiednie wartości parametrów klinicznych w czasie rebiopsji.

Dane dotyczące powyższych korelacji umieszczono w tabeli 25.

Tabela 25. Analiza zależności między nasileniem włóknienia śródmiąższowego (badanym metodą półautomatyczną i automatyczną) a średnim dobowym białkomoczem, stężeniem kreatyniny w surowicy krwi oraz klirensem kreatyniny w całej badanej grupie w czasie biopsji.

Nasilenie włóknienia śródmiąższowego (AP i AA) a różne parametry kliniczne w czasie biopsji	N	r	p
AP & średnia Uprot	46	0,91	<0,001
AP & Pcr	46	0,88	<0,001
AP & Ccr	46	-0,89	<0,001
AA & średnia Uprot	46	0,90	<0,001
AA & Pcr	46	0,87	<0,001
AA & Ccr	46	-0,87	<0,001

N – liczba biopłatów, r – współczynnik korelacji Spearmana, p – poziom istotności, AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna, średnia Uprot – średni białkomocz dobowy (g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min);

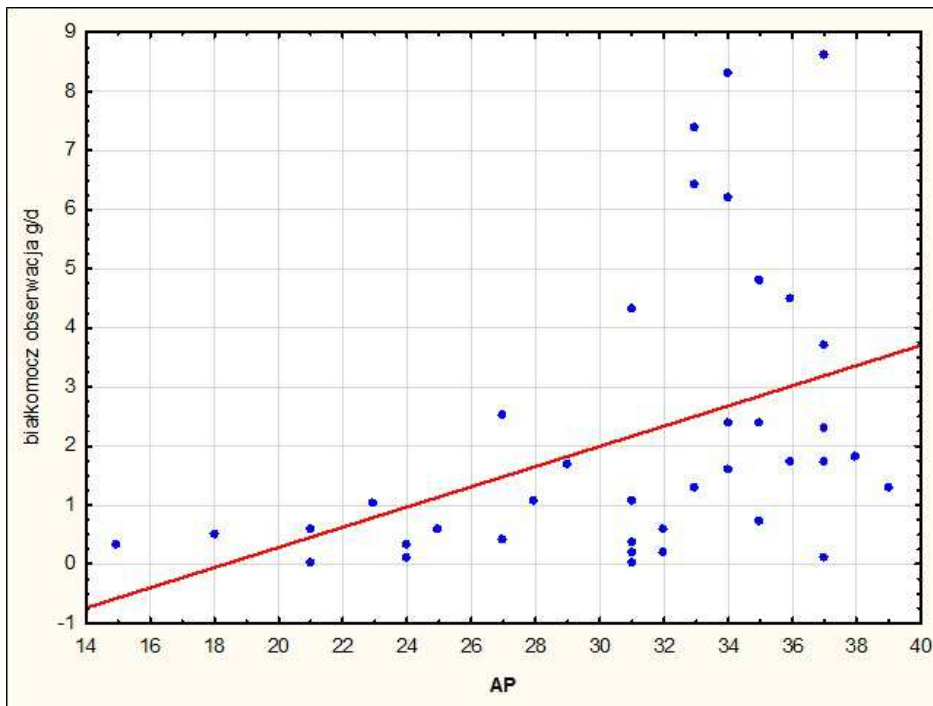
Podobnie silne zależności odnotowano pomiędzy wynikami uzyskanymi obiema metodami pomiaru pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego a największą dobową utratą białka z moczem, stężeniem kreatyniny w surowicy krwi oraz wartościami klirensu kreatyniny po 2 latach obserwacji w całej badanej grupie (39 chorych). Dane przedstawia tabela 26 i ryciny 9-14.

Tabela 26. Analiza zależności między nasileniem włóknienia śródmiąższowego a największą dobową utratą białka, stężeniem kreatyniny w surowicy krwi oraz klirensiem kreatyniny w całej badanej grupie po 2 latach obserwacji.

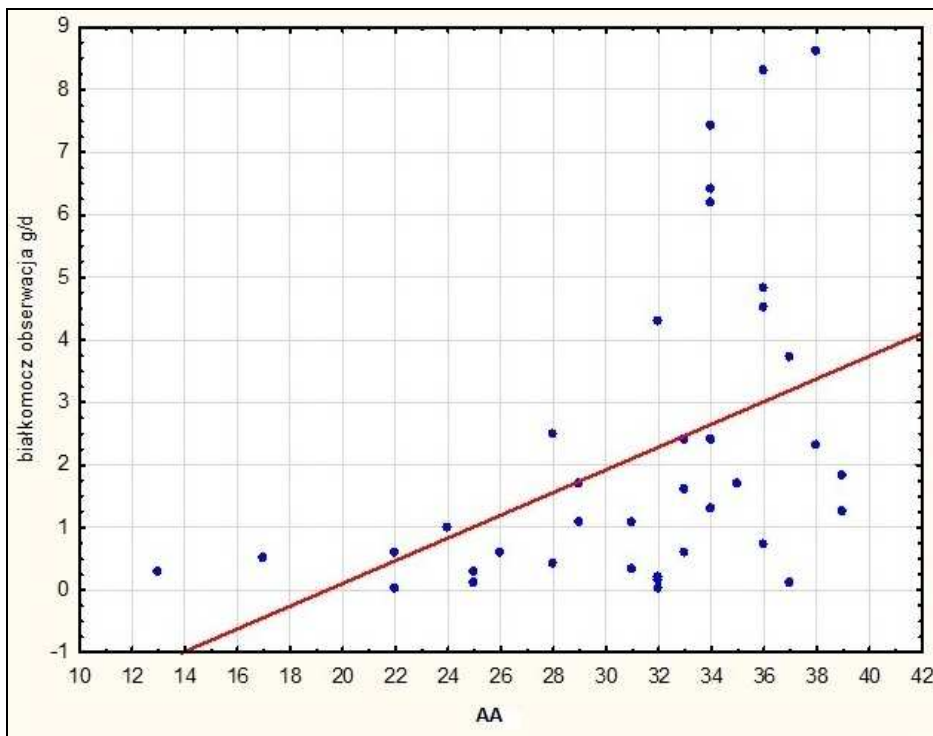
% włóknienia śródmiąższowego (AP i AA) a różne cechy kliniczne po 2 latach obserwacji	N	R	p
AP & Uprot	39	0,53	<0,001
AP & Pcr	39	0,90	<0,001
AP & Ccr	39	-0,84	<0,001
AA & Uprot	39	0,57	<0,001
AA & Pcr	39	0,92	<0,001
AA & Ccr	39	-0,84	<0,001

N – liczba biopłatów, r – współczynnik korelacji Spearmana, p – poziom istotności, AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna, Uprot – największa dobową utratą białka z moczem (g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min);

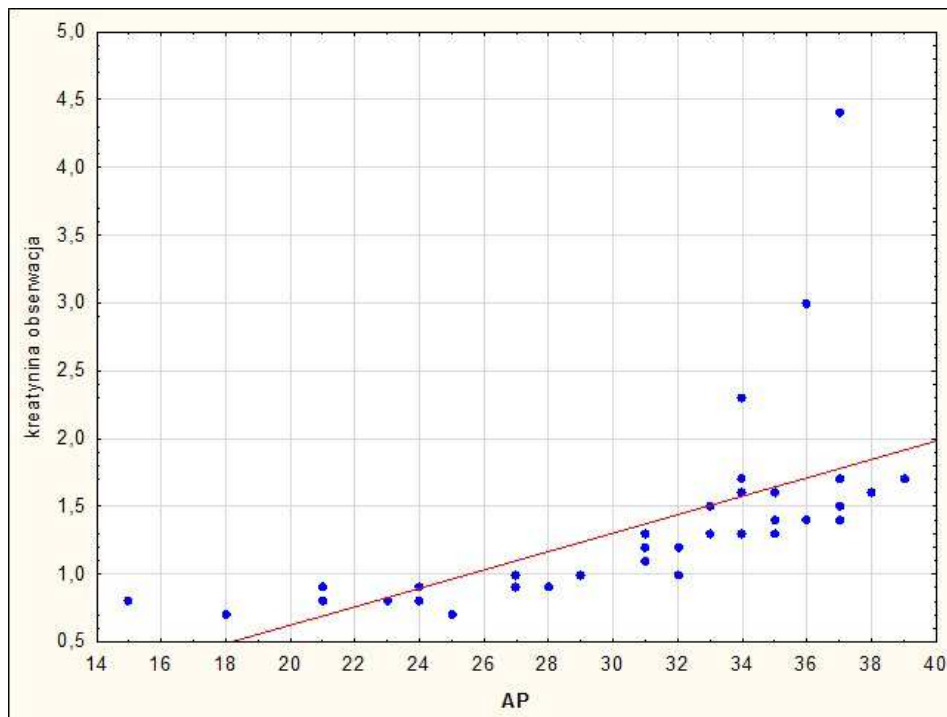
Rycina 9. Wykres ilustruje zależność między najwyższym dobowym białkomoczem (g/d) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego w całej badanej grupie po 2 latach obserwacji (analiza metodą półautomatyczną – AP).



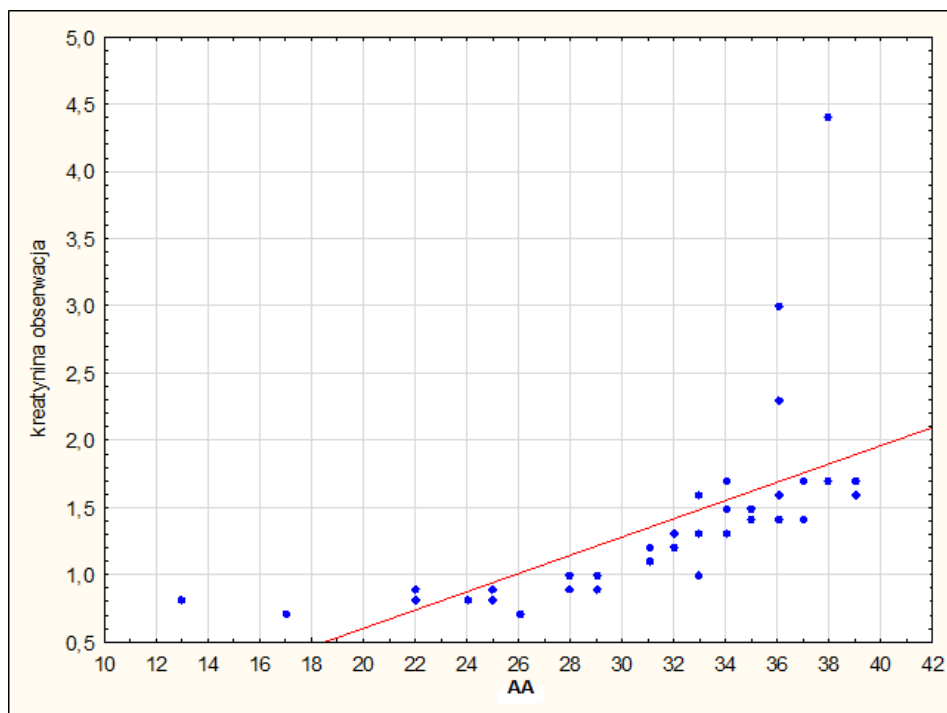
Rycina 10. Wykres ilustruje zależność między najwyższym dobowym białkomoczem (g/d) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego w całej badanej grupie po 2 latach obserwacji (analiza metodą automatyczną – AA).



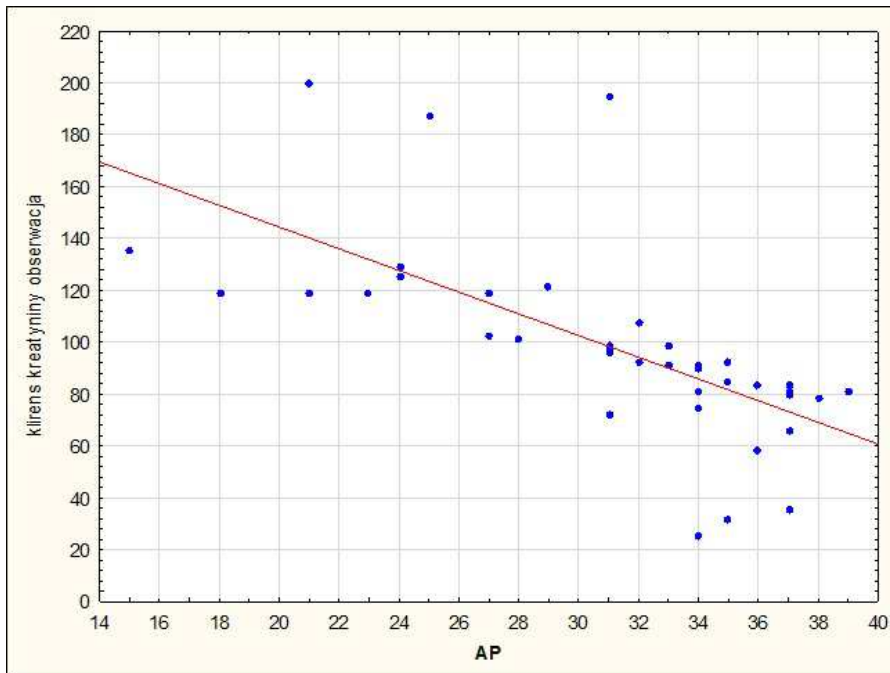
Rycina 11. Wykres ilustruje zależność między stężeniem kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego w całej badanej grupie po 2 latach obserwacji (analiza metodą półautomatyczną – AP).



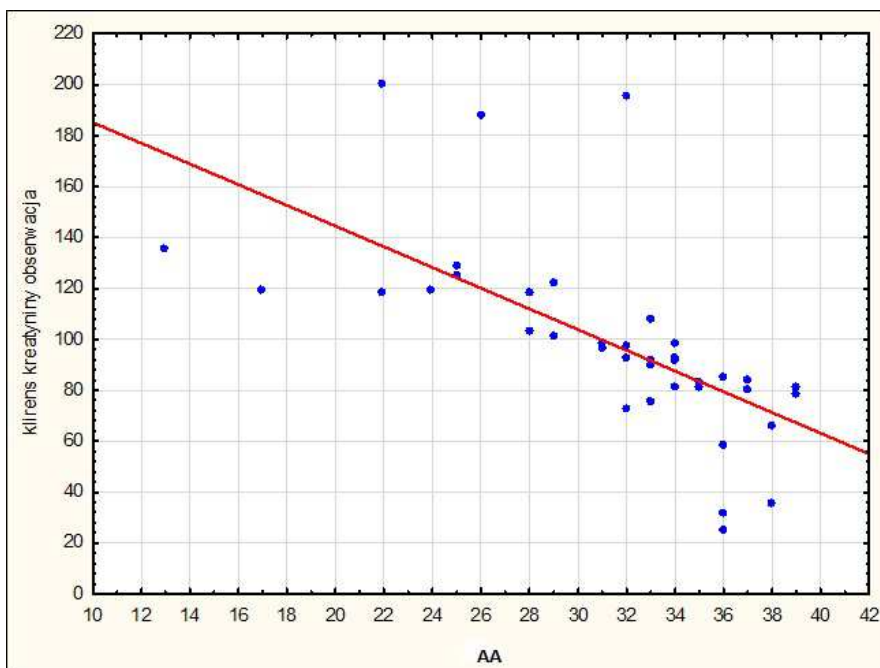
Rycina 12. Wykres ilustruje zależność między stężeniem kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego w całej badanej grupie po 2 latach obserwacji, (analiza metodą automatyczną – AA).



Rycina 13. Wykres ilustruje zależność między klirensem kreatyniny (ml/min) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego w całej badanej grupie po 2 latach obserwacji (analiza metodą półautomatyczną – AP).



Rycina 14. Wykres ilustruje zależność między klirensem kreatyniny (ml/min) a nasileniem włóknienia śródmiąższowego w całej badanej grupie po 2 latach obserwacji (analiza metodą automatyczną – AA).



Kolejne porównania dotyczyły wyników leczenia i obserwacji po 10 latach choroby w całej badanej grupie, niezależnie od typu rozpoznanej glomerulopatii. W grupie chorych, u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek (N=26) nasilenie włóknienia śródmiąższowego w analizie półautomatycznej wahało się od 31 do 39% (średnio $34,28 \pm 2,48\%$). W analizie automatycznej uzyskano identyczny zakres wartości (średnio $34,60 \pm 2,43\%$). U pozostałych chorych (N=13), u których klinicznie przebieg był bardziej korzystny (progresja, poprawa stanu klinicznego bądź całkowita remisja) nasilenie włóknienia śródmiąższowego w analizie półautomatycznej wahało się od 15 do 36% (średnio $25,14 \pm 5,70\%$). Odpowiednie wartości w analizie automatycznej wyniosły od 13 do 36% (średnio $25,50 \pm 5,95\%$). W przypadku chorych, u których nie udało się osiągnąć remisji i doszło do postępu choroby (N=3) odsetek włóknienia śródmiąższowego wynosił w analizie półautomatycznej od 24 do 34% (średnio $28,67 \pm 5,03\%$), natomiast w analizie automatycznej od 25 do 33% (średnio $29,00 \pm 4,00\%$). W liczącej 3 osoby grupie pacjentów, u których wskutek leczenia udało się uzyskać poprawę stanu klinicznego odsetek włóknienia śródmiąższowego w analizie półautomatycznej wahał się od 23 do 29% (średnio $26,33 \pm 3,06\%$). W analizie automatycznej było to odpowiednio od 24 do 29% (średnio $27,00 \pm 2,65\%$). U chorych, którzy po 10 latach obserwacji osiągnęli remisję (N=7) nasilenie włóknienia śródmiąższowego w analizie półautomatycznej wyniosło od 15 do 27% (średnio $21,57 \pm 4,16\%$). W analizie automatycznej wartości te wyniosły odpowiednio od 13 do 28% (średnio $21,86 \pm 5,27\%$).

Zanotowano statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą chorych ze schyłkową niewydolnością nerek a pozostałymi pacjentami w odniesieniu do odsetka włóknienia śródmiąższowego zarówno w analizie półautomatycznej, jak i automatycznej ($p < 0,001$). Nasilenie włóknienia śródmiąższowego u chorych, którzy osiągnęli remisję ($21,57 \pm 4,16\%$ w analizie półautomatycznej i $21,86 \pm 5,27\%$ w analizie automatycznej) także różnił się w stosunku do tych, u których wystąpiła poprawa stanu klinicznego (odpowiednio oboma metodami $26,33 \pm 3,06\%$ i $27,00 \pm 2,65\%$) czy progresja choroby ($28,67 \pm 5,03\%$;

29,00±4,00%), jednak nie można było ocenić statystycznej istotności ze względu na małą liczebność grup.

Dane dotyczące nasilenia włóknienia śródmiąższowego u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek, progresją choroby, poprawą stanu klinicznego oraz remisją przedstawiono w tabelach 27-29.

Tabela 27. Analiza nasilenia włóknienia śródmiąższowego u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek po 10 latach obserwacji.

SNN	N	min	max	śr±SD
AP	26	31,00	39,00	34,28±2,48
AA	26	31,00	39,00	34,60±2,43

SNN – schyłkowa niewydolność nerek, N – liczba chorych, AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna, min – najniższy % włóknienia, max – najwyższy % włóknienia, śr ± SD – średni % włóknienia i odchylenie standardowe.

Tabela 28. Analiza nasilenia włóknienia śródmiąższowego u chorych z progresją, poprawą i remisją po 10 latach obserwacji.

PG + PP + R	N	min	max	śr±SD
AP	13	15,00	36,00	25,14±5,70
AA	13	13,00	36,00	25,50±5,95

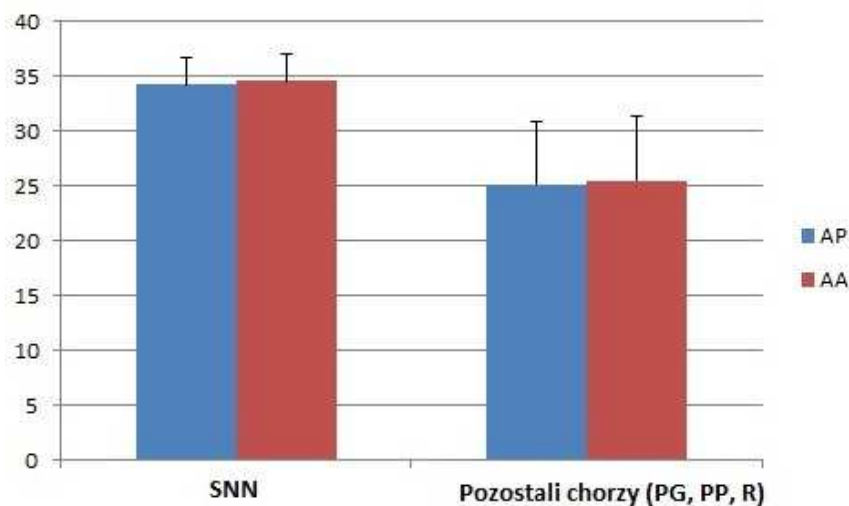
PG – progresja, PP – poprawa, R – remisja, N – liczba chorych, AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna, min – najniższy % włóknienia, max – najwyższy % włóknienia, śr ± SD – średni % włóknienia i odchylenie standardowe.

Tabela 29. Analiza nasilenia włóknienia śródmiąższowego u chorych z remisją po 10 latach obserwacji.

R	N	min	max	śr±SD
AP	7	15,00	27,00	21,57± 4,16
AA	7	13,00	28,00	21,86±5,27

R – remisja, N – liczba chorych, AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna, min – najniższy % włóknienia, max – najwyższy % włóknienia, śr ± SD – średni % włóknienia i odchylenie standardowe.

Rycina 15. Porównanie nasilenia włóknienia śródmiąższowego (mierzonego metodą półautomatyczną i automatyczną) między grupą chorych, u których doszło do SNN a pozostałymi pacjentami po 10 latach obserwacji.



SNN – schyłkowa niewydolność nerek, PG – progresja, PP – poprawa, R – remisja,
AP – analiza półautomatyczna, AA – analiza automatyczna.

W grupie chorych, u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek średnia dobowa utrata białka z moczem w czasie biopsji wahała się od 0,40 do 6,10g/d (średnio $4,54 \pm 0,68$ g/d). U pozostałych chorych (z progresją, poprawą kliniczną bądź remisją) średnia dobowa utrata białka z moczem wahała się od 0 do 5,30g/d (średnio $3,66 \pm 0,69$ g/d). Analiza zależności ujawniła statystycznie istotną różnicę pomiędzy grupą chorych ze schyłkową niewydolnością nerek a pozostałymi chorymi ($p < 0,001$) (tabele 30-32).

Stężenie kreatyniny w surowicy krwi w czasie biopsji u chorych, u których po 10 latach obserwacji rozwinęła się schyłkowa niewydolność nerek wynosił od 1,60 do 2,90mg/dl (średnio $2,00 \pm 0,35$ mg/dl). U pozostałych chorych wartości te wynosiły odpowiednio od 0,90 do 2,30mg/dl (średnio $1,31 \pm 0,38$ mg/dl). Różnice między tymi grupami były statystycznie istotne ($p < 0,001$).

Wartości klirensu kreatyniny w grupie chorych, u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek wyniosły w czasie biopsji od 40,90 do 97,70ml/min (średnio $66,03 \pm 15,86$ ml/min). U pozostałych chorych wartości te

wahały się od 65,19 do 123,80 ml/min (średnio $96,47 \pm 16,63$ ml/min). Różnice te także były statystycznie istotne ($p < 0,001$).

Po 2 latach obserwacji u chorych, u których później doszło do schyłkowej niewydolności nerek największa dobową utratą białka z moczem wahała się od 0,00 do 8,60 g/d (średnio $2,86 \pm 2,71$ g/d). U pozostałych chorych wartości te wyniosły odpowiednio od 0,00 do 4,50 g/d (średnio $1,08 \pm 1,21$ g/d). Grupy te różniły się statystycznie istotnie ($p = 0,04$). W grupie chorych, u których rozwinęła się schyłkowa niewydolność nerek stężenie kreatyniny w surowicy krwi po 2 latach obserwacji wahało się od 1,00 do 4,40 mg/dl (średnio $1,56 \pm 0,66$ mg/dl). Między tą grupą a pozostałymi chorymi odnotowano statystycznie istotną różnicę ($p < 0,001$), gdyż stężenie kreatyniny w surowicy krwi wyniosło u nich od 0,70 do 3,00 mg/dl (średnio $1,04 \pm 0,59$ mg/dl). Klirens kreatyniny także różnił się statystycznie istotnie ($p < 0,001$), wynosił on bowiem u chorych, u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek od 25,00 do 195,00 ml/min (średnio $86,57 \pm 29,68$ ml/min). U pozostałych chorych wartości te wyniosły odpowiednio od 58,60 do 200,00 ml/min (średnio $123,39 \pm 35,50$ ml/min).

Tabela 30. Wartości najniższe, najwyższe oraz średnie wraz z odchyleniem standardowym dotyczące dobowej utraty białka z moczem, średniej dobowej utraty białka z moczem, stężenia kreatyniny w surowicy krwi i klirensu kreatyniny w czasie biopsji i po 2 latach obserwacji w grupie chorych, u których rozwinęła się schyłkowa niewydolność nerek.

SNN	N	min-max	śr $\pm$ SD
Uprot średnia w czasie biopsji	26	0,40-6,10	$7,63 \pm 0,68$
Pcr w czasie biopsji	26	1,60-2,90	$2,00 \pm 0,35$
Ccr w czasie biopsji	26	40,90-97,70	$66,03 \pm 15,86$
Uprot po 2 latach obserwacji	26	0,00-8,60	$2,86 \pm 2,71$
Pcr po 2 latach obserwacji	26	1,00-4,40	$1,56 \pm 0,66$
Ccr po 2 latach obserwacji	26	25,00-195,00	$86,57 \pm 29,68$

SNN – schyłkowa niewydolność nerek, N – liczba chorych, U prot – najwyższa dobową utratą białka z moczem (w g/d), Uprot średnia – średnia dobową utratą białka z moczem (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min).

Tabela 31. Wartości najniższe, najwyższe oraz średnie wraz z odchyleniem standardowym dotyczące dobowej utraty białka z moczem, średniej dobowej utraty białka z moczem, stężenia kreatyniny w surowicy krwi i klirensu kreatyniny w czasie biopsji i po 2 latach obserwacji w grupie pozostałych chorych (z progresją, poprawą kliniczną bądź remisją).

PG + PP + R	N	min-max	śr±SD
Uprot średnia w czasie biopsji	13	0-5,30	3,66±0,69
Pcr w czasie biopsji	13	0,90-2,30	1,31±0,38
Ccr w czasie biopsji	13	65,19-123,80	96,47±16,63
Uprot po 2 latach obserwacji	13	0,00-4,50	1,08±1,21
Pcr po 2 latach obserwacji	13	0,70-3,00	1,04±0,59
Ccr po 2 latach obserwacji	13	58,60-200,00	123,39±35,50

PG – progresja, PP – poprawa, R – remisja, N – liczba chorych, U prot – najwyższa dobową utratą białka z moczem (w g/d), Uprot średnia – średnia dobową utratą białka z moczem (w g/d), Pcr –stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl) , Ccr – klirens kreatyniny (ml/min).

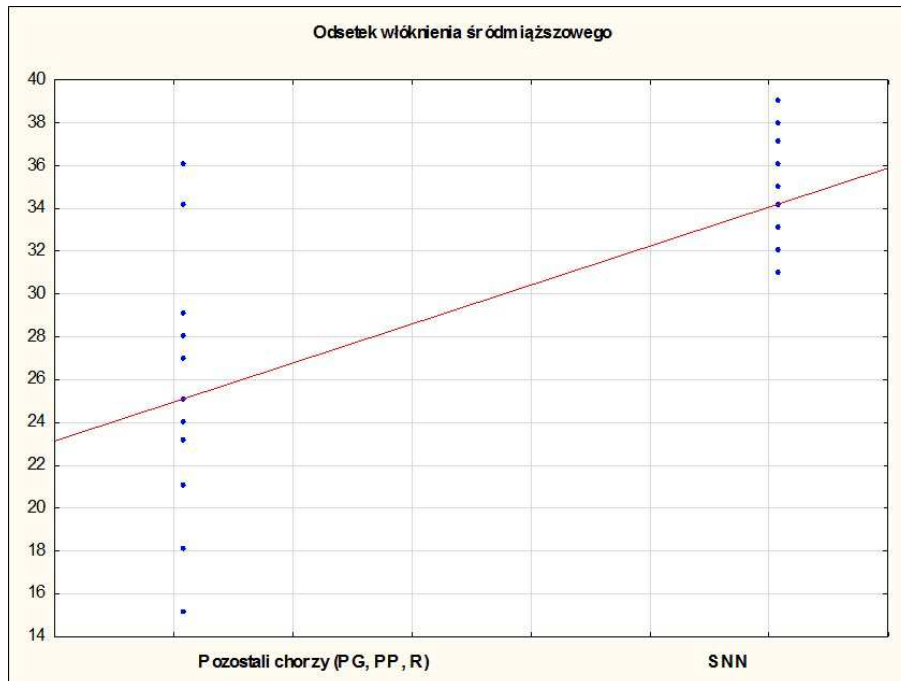
Tabela 32. Analiza statystyczna dotycząca porównania grupy chorych, u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek z pozostałymi pacjentami w zakresie poszczególnych parametrów klinicznych w czasie biopsji oraz po 2 latach obserwacji.

SNN vs pozostali chorzy (PG + PP + R)	p
Uprot średnia w czasie biopsji	<0,001
Pcr w czasie biopsji	<0,001
Ccr w czasie biopsji	<0,001
Uprot po 2 latach obserwacji	0,04
Pcr po 2 latach obserwacji	<0,001
Ccr (ml/min) po 2 latach obserwacji	<0,001

SNN – schyłkowa niewydolność nerek poprawa, PG – progresja, PP – poprawa, R – remisja, U prot – najwyższa dobową utratą białka z moczem (w g/d), Uprot średnia – średnia dobową utratą białka z moczem (w g/d), Pcr – stężenie kreatyniny w surowicy krwi (mg/dl), Ccr – klirens kreatyniny (ml/min), p – poziom istotności.

Odsetek włóknienia w grupie chorych, u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek wyraźnie różnił się od wyników uzyskanych u pozostałych pacjentów (PG, PP, R), osiągając wartość ponad 30%. Niestety, grupa chorych z lepszym przebiegiem klinicznym liczyła zaledwie 13 osób, w związku z tym nie udało się uzyskać statystycznej istotności.

Rycina 16. Porównanie nasilenia włóknienia śródmiąższowego między grupą chorych, u których doszło do SNN a pozostałymi pacjentami po 10 latach obserwacji.



SNN – schyłkowa niewydolność nerek, PG – progresja, PP – poprawa, R – remisja.

OMÓWIENIE

Opracowanie niniejsze obejmuje grupę dorosłych chorych z różnymi pierwotnymi glomerulopatiami diagnozowanych w latach 1991-2003. W tym miejscu konieczne jest podkreślenie sposobu doboru badanej grupy. Decydująca w tym względzie okazała się możliwość uzyskania dokładnych danych klinicznych, a także długość czasu obserwacji (od 10 do 23 lat). Na wybór przypadków do opracowania morfometrycznego wpłynął także fakt, że u części chorych liczba kłębuszków w biopsji wynosi poniżej 10. W mojej pracy umieściłam jedynie przypadki, w których w bioptacie znalazło się 10 i więcej kłębuszków (średnio 14,21). Zgodnie z doniesieniami innych autorów [111] uznałam bowiem, że wtedy znajdzie się w badanym materiale odpowiednio duży fragment utkania śródmiąższu.

Komputerowa analiza obrazu staje się coraz częściej stosowanym narzędziem w ocenie preparatów mikroskopowych biopsji nerek. Ocena dokonywana przez patologa jest zawsze subiektywna, nawet jeżeli dokonuje jej kilku doświadczonych patologów. Początkowo wprowadzono metody półilościowe, które w kilkupunktowej skali oceniały zmiany w kłębuszkach nerkowych bądź w śródmiąższu. Okazały się one bardzo przydatne, często je stosowano i nadal są w powszechnym użyciu, pomimo iż także obarczone są ryzykiem subiektywizmu [29, 68, 75, 112]. Z tego powodu zaczęto wprowadzać metody cyfrowej analizy obrazu. Sprzyjał temu także szybki rozwój bioinformatyki, usprawnienie narzędzi programowania, coraz niższe ceny sprzętu komputerowego, powszechna dostępność bezpłatnego (freeware) specjalistycznego oprogramowania, a także wzrost mocy obliczeniowej komputerów.

W przypadku chorób nerek w odniesieniu do nasilenia włóknienia śródmiąższowego stosowanie morfometrycznych metod analizy obrazu nie jest zbyt powszechne. Kilka doniesień dotyczy chorych po przeszczepieniu nerek. Diaz-Encarnacion i wsp. badali półilościowo oraz metodą półautomatyczną u

chorych z przewlekłym odrzucaniem przeszczepu zależność między odsetkiem włóknienia śródmiąższowego a takimi parametrami klinicznymi jak poziom filtracji kłębuszkowej, dobową utratą białka z moczem i stężenie kreatyniny w surowicy krwi. Do oceny nasilenia włóknienia śródmiąższowego używali oni preparatów barwionych czerwienią Syriusza oraz metodą trójbarwną wg Massona. Uzyskane przez nich wyniki potwierdziły ważną rolę oceny morfometrycznej nasilenia śródmiąższowego w rokowaniu u chorych ze świeżo rozpoznanym przewlekłym odrzucaniem przeszczepu [75]. Bakker i wsp. oceniali u chorych po przeszczepieniu nerki gromadzenie lamininy $\beta 2$ i kolagenu IV w śródmiąższu przy użyciu programu do automatycznej analizy obrazu, także uzyskując zależności między ekspresją badanych markerów a parametrami klinicznymi [76]. Danilewicz i wsp. badali grupę pacjentów z ostrym odrzucaniem przeszczepu. Wykazali oni, iż wzrost ekspresji tryptazy komórek tucznych, α -SMA, wzrost objętości śródmiąższu i zwiększenie liczby komórek CD68+, CD43+, CD20+ ma znaczący wpływ na odrzut przeszczepu w porównaniu z pacjentami, u których przeszczep się przyjął [113]. Chea i wsp. przy użyciu programu do półautomatycznej analizy obrazu (ImageJ) porównywali immunoekspresję α -SMA, E-kadheryny, wimentyny, TGF- $\beta 1$ oraz Smad 2/3 u pacjentów z autosomalnie dominującym zespołem wielotorbielowatości nerek [77]. Zmiany śródmiąższowe w warunkach doświadczalnej nefropatii wywołanej obciążeniem białkiem badali Shimizu i wsp. Użyli oni analizy półautomatycznej w preparatach barwionych czerwienią Syriusza do oceny stopnia uszkodzenia śródmiąższu przez cytokinę prozapalną MCP-1 [78].

Także nieliczne są w piśmiennictwie opracowania analizujące włóknienie śródmiąższowe w przypadku różnych glomerulopatii. Kilka prac dotyczy chorych z nefropatią IgA. Liu i wsp. oceniali rolę komórek tucznych w patogenezie zmian cewkowo-śródmiąższowych w tej nefropatii. Uzyskali oni silną zależność między liczbą komórek tucznych a nasileniem włóknienia śródmiąższowego, które analizowano metodą półautomatyczną w preparatach barwionych wg metody trójbarwnej Massona [79]. Wągrowska-Danilewicz i wsp. badali immunoekspresję chemokin CC i ich receptorów u chorych z

nefropatią IgA i innymi kłębuszkowymi zapaleniami nerek przebiegającymi z proliferacją komórek mezangialnych, porównując je z objętością śródmiaższu [114]. Komputerowa analiza obrazu mikroskopowego przeprowadzona przez Stein-Oakley i wsp. wykazała wzrost ekspresji receptora β i czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) w obszarach włóknienia śródmiaższowego u chorych z nefropatią IgA i FSGS [115]. Nowym markerem uszkodzenia śródmiaższu w nefropatii IgA okazała się nestyna. Jest to białko filamentów pośrednich, które w warunkach prawidłowych obecne jest jedynie w podocytach. Jego pojawienie się zaobserwowano w śródmiaższu w nefropatii IgA uzyskując zależność między stopniem ekspresji nestyny a nasileniem włóknienia śródmiaższowego. Komórki z obecnością nestyny ujawniały także CD34 i α -SMA, co sugeruje, że były to śródmiaższowe miofibroblasty [116]. Danilewicz i wsp. badali w biopsjach pacjentów z kłębuszkowymi zapaleniami nerek przebiegającymi z proliferacją komórek mezangialnych, a także w glomerulopatii błoniastej korelacje pomiędzy ekspresją tryptazy komórek tucznych w śródmiaższu, obecnością α -SMA a wzrostem objętości śródmiaższu [117, 118]. Otsubo i wsp. za pomocą programu do analizy półautomatycznej oceniali odsetek włóknienia śródmiaższu w preparatach barwionych metodą trójbarwną wg Massona korelując go z ekspresją tryptazy komórek tucznych i obecnością α -SMA u chorych ze zmianami kłębuszkowymi w przebiegu zapalenia naczyń związanego z przeciwciałami ANCA [119].

Ponieważ w ocenie biopsji nerek niezwykle ważne jest ustalenie w jaki sposób zachowuje się śródmiaższ, tzn. jakie jest nasilenie włóknienia śródmiaższowego przebiegającego z zanikami cewek, postanowiłam zająć się jego dokładną oceną. Do uwidocznienia włóknienia śródmiaższowego służą różne metody barwienia. Wyboru metody w moich badaniach dokonałam na podstawie opracowania Diaz Encarnacion i wsp., którzy porównywali cały ich szereg (tzn. metodę trójbarwną Massona, barwienie czerwienią Syriusza, a także ocenę w mikroskopie polaryzacyjnym preparatów barwionych czerwienią Syriusza). W ich pracy najlepszą metodą okazało się badanie preparatów barwionych czerwienią Syriusza. Autorzy jedynie w tej metodzie uzyskali

znaczącą korelację między poziomem filtracji kłębuszkowej w czasie biopsji a nasileniem włóknienia śródmiąższowego [75].

W badanym przeze mnie materiale zastosowałam półautomatyczną i automatyczną metodę analizy obrazu. Wartości nasilenia włóknienia śródmiąższowego uzyskane przy użyciu obu tych metod nie różniły się statystycznie istotnie ($p=0,06$). Natomiast bardzo duże różnice można zaobserwować w praktycznym, codziennym użyciu obydwu tych metod. W analizie półautomatycznej najistotniejszym, tzw. momentem krytycznym, po zastosowaniu filtrów uśredniających obraz, jest ustalenie progu jasności. Należy przy tym zaznaczyć, że za każdym razem, gdy opracowywane jest nowe zdjęcie należy od nowa ustawić próg jasności, co jest bardzo czasochłonne. Opracowanie jednego zdjęcia trwa około 0,5-1,5 minuty i wynik uzyskiwany jest w pikselach, które następnie muszą zostać przeliczone na wartości procentowe, a w każdej badanej biopsji opracowywano średnio około 60 zdjęć. Podobny czas wykonania jednego badania metodą półautomatyczną uzyskali inni autorzy (15-30 minut) [75]. W przypadku użycia analizy automatycznej wszystkie kolejne etapy są odpowiednio zaprogramowane (bez ingerencji użytkownika), powoduje to, że czas opracowania jednego zdjęcia skraca się do kilku sekund i uzyskany wynik jest podany w procentach.

W badanej grupie chorych liczącej 39 osób (46 bioptatów) największą liczbę stanowili pacjenci z ogniskowym, segmentalnym stwardnieniem kłębuszków nerkowych ($N=22$, 56,41%). Jest to jedna z najczęściej występujących glomerulopatii, której klinicznie towarzyszy zespół nerczycowy, krwinkomocz, a także czasami nadciśnienie tętnicze [106, 108]. We wszystkich badanych przeze mnie przypadkach stwierdzono podtyp niespecyficzny FSGS (FSGS, NOS) [108]. U chorych obecne były segmentalne ogniska sklerotyzacji, dodatnie w reakcji paS oraz barwiące się na czarno w preparatach impregnowanych solami srebra wg metody Jonesa [106, 108]. W części przypadków ($N=15$) wykonano także badanie elektronowo-mikroskopowe, w którym stwierdzano przybytek macierzy mezangialnej z towarzyszeniem złogów oraz znikanie wypustek nóżkowatych podocytów, a badanie

immunofluorescencyjne we wszystkich przypadkach wykazało głównie obecność złogów IgM i C3 o różnym nasileniu. W moich badaniach średnie pole powierzchni włóknienia śródmiąższowego w grupie FSGS wyniosło w analizie półautomatycznej $33,15 \pm 4,75\%$, a w analizie automatycznej $33,44 \pm 4,48\%$. Wartości te różniły się statystycznie znamienne od wyników pomiarów uzyskanych w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). Nieco niższy odsetek włóknienia śródmiąższowego niż w moim badaniu odnotowali u chorych z FSGS Bohle i wsp. W opublikowanej przez nich pracy wyniósł on bowiem $27,38\%$ [21]. Przyczyną jest najprawdopodobniej fakt, że w badanej przeze mnie grupie u zdecydowanej większości chorych ($18/22$, $81,8\%$) doszło w dalszym przebiegu choroby do rozwoju schyłkowej niewydolności nerek. Dużo niższą wartość uzyskał Danilewicz ($18,8\%$) [90]. Autorzy ci jednak używali innej metody i nie stosowali barwienia czerwienią Syriusza w celu ujawnienia włóknienia śródmiąższowego, a ponadto nieznany był dalszy przebieg choroby w prezentowanej przez nich grupie FSGS. Dlatego bezwzględne wartości mogą się nieco różnić. U 5 chorych z tej grupy wykonano rebiopsję i materiał ten także poddano ocenie morfometrycznej. Wartości nasilenia włóknienia śródmiąższowego były tylko nieco wyższe od uzyskanych w pierwszej biopsji, ponieważ biopsje te były w większości wykonane po stosunkowo krótkim czasie (średnio 16,8 miesięcy).

U 6 chorych z rozpoznaniem nefropatii IgA w obrazie świetlno-mikroskopowym obecny był w ponad połowie kłębuszków rozplem komórek mezangialnych a także w różnej liczbie półksiężycowate zrosty komórkowe. Rozpoznano w związku z tym IV klasę nefropatii IgA wg Haasa [109]. We wszystkich przypadkach w badaniu immunofluorescencyjnym obecne były mezangialne, ziarniste złogi IgA czasem z towarzyszeniem innych złogów immunokompleksów. Średnia wartość nasilenia włóknienia śródmiąższowego wyniosła w tej grupie w metodzie półautomatycznej $24,33 \pm 6,38$, a w metodzie automatycznej $24,67 \pm 7,09$. Wartości te różniły się statystycznie znamienne od pomiarów w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). Wyniki moich pomiarów nasilenia włóknienia śródmiąższowego były nieco wyższe niż w badaniach Danilewicza i

wsp. [118], gdzie w grupie pacjentów z taką samą glomerulopatią z towarzyszeniem białkomoczu wyniosły $20,12 \pm 8,45\%$. Występowanie białkomoczu w nefropatii IgA jest związane zwykle z obecnością bardziej nasilonych zmian morfologicznych, jakie widuje się w klasie III, IV czy V wg Haasa. Dlatego uważam, że badaną przeze mnie grupę nefropatii IgA można porównać z grupą prezentowaną przez Danilewicza i wsp. Chcę zaznaczyć także, iż cytowani autorzy użyli półautomatycznej metody z zastosowaniem siatki stereologicznej z regulowaną liczbą punktów, a preparaty barwione były wg metody trójbarwnej Massona. W porównaniu z grupą kontrolną odnotowałam w nefropatii IgA ponad dwukrotny wzrost nasilenia włóknienia śródmiąższowego. Do podobnych wniosków doszli Mackensen-Haen i wsp. [69].

Grupa chorych z glomerulopatią błoniastą liczyła 5 przypadków. Zmiany morfologiczne obejmowały przede wszystkim pogrubienie ścian pętli naczyniowych, miejscami bardziej równomierne, miejscami mniej regularne. W impregnacji solami srebra wg metody Jonesa ogniskowo widoczne były tzw. „kolce”, czyli wypustki błony podstawnej tworzące się pomiędzy złogami immunokompleksów zlokalizowanymi podnabłonkowo. W trzech przypadkach wykonano badanie elektronowo-mikroskopowe, które ujawniło złogi podnabłonkowe, ale także inkorporowane w obręb błony podstawnej oraz pogrubienie błon podstawnych. We wszystkich przypadkach w badaniu immunofluorescencyjnym stwierdzono obecność ziarnistych złogów IgG i C3 w lokalizacji naczyniowej. Nasilenie włóknienia śródmiąższowego wyniosło w tej grupie średnio $30,67 \pm 3,61\%$ w analizie półautomatycznej, a $31,33 \pm 3,69\%$ w analizie automatycznej. Wartości te różniły się statystycznie istotnie od wyników uzyskanych w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). Wzrost nasilenia włóknienia śródmiąższowego w glomerulopatii błoniastej zaobserwowali Lee i wsp. [121], Danilewicz i wsp. [118], Horvatic i wsp. [111]. W badaniach prowadzonych przez Lee i wsp. oraz Danilewicza i wsp. uzyskane wartości procentowe były dość niskie (18,2%). W badanej przeze mnie grupie były one znacząco wyższe, ale grupa ta liczyła jedynie 6 chorych i u 5 z nich doszło do progresji lub

rozwoju schyłkowej niewydolności nerek. W dużej grupie chorych z glomerulopatią błoniastą, liczącej 60 pacjentów, Horvatic i wsp. porównali nasilenie włóknienia śródmiąższowego między grupą chorych z dobrym przebiegiem klinicznym, a tymi u których doszło do schyłkowej niewydolności nerek lub zgonu. W tej ostatniej grupie uzyskali średnią wartość nasilenia włóknienia śródmiąższowego 38,40% (30,00-50,00%). Mimo, iż użyli oni innej metody barwienia – metody trójbarwnej wg Massona – uzyskane wartości bezwzględne były porównywalne z moimi wynikami. W badanej przez nich grupie udało się także uzyskać istotne statystycznie różnice w odniesieniu do włóknienia śródmiąższowego w przebiegu klinicznym. Chorzy, u których odsetek włóknienia śródmiąższowego wynosił powyżej 18% mieli gorszy przebieg kliniczny. Z kolei w grupie pacjentów z korzystnym przebiegiem klinicznym wskaźnik ten wynosił 18% lub mniej [111]. W całej badanej przez mnie grupie także udało się wskazać wartość nasilenia włóknienia śródmiąższowego (30%), powyżej której przebieg kliniczny okazał się gorszy, tzn. doszło do schyłkowej niewydolności nerek wymagającej leczenia nerko-zastępczego. Ze względu na małą liczbę przypadków (N=13) w grupie z bardziej korzystnym przebiegiem klinicznym nie można było potwierdzić statystycznej istotności.

W badanej grupie znalazło się 5 przypadków zapalenia błoniasto-rozplemowego typu I. W badaniu świetlno-mikroskopowym widoczny był nasilony rozplem komórek mezangialnych, wzrost ilości macierzy mezangialnej, a także znacznego stopnia pogrubienie ścian pętli włosniczkowych. W preparatach impregnowanych solami srebra wg metody Jonesa odcinkowo ujawniono charakterystyczne podwójne okonturowanie błony podstawnej włosniczek. W badaniach immunofluorescencyjnych ujawniono we wszystkich badanych przypadkach ziarniste złogi IgG i frakcji C3 dopełniacza w lokalizacji mieszanej, tzn. w obrębie mezangium i wzdłuż pętli włosniczkowych. W badaniu elektronowo-mikroskopowym zaobserwowano podśródbłonkowe i mezangialne złogi, a także interpozycję komórek mezangium na obwód pętli. W analizie półautomatycznej pole powierzchni włóknienia śródmiąższowego w tej

grupie wyniosło $31,50 \pm 6,95\%$, a w analizie automatycznej $31,50 \pm 7,45\%$. Uzyskane wartości były statystycznie znamienne różne od pomiarów dokonanych w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). W przypadku tej glomerulopatii opublikowano nieliczne doniesienia. Uzyskane przez innych autorów wartości dotyczące nasilenia włóknienia śródmiąższowego oscylują wokół 20% [118, 122]. Autorzy prezentowali większe grupy badanych chorych i nie podali danych dotyczących obserwacji klinicznych po wielu latach trwania choroby. W całej badanej przeze mnie grupie u 4 pacjentów postęp choroby doprowadził do schyłkowej niewydolności nerek, a jedynie w jednym przypadku zaobserwowano remisję. Ten niekorzystny przebieg kliniczny miał najprawdopodobniej związek z uzyskanymi przeze mnie wyższymi wynikami pomiarów nasilenia włóknienia śródmiąższowego. W dwóch przypadkach z grupy zapalenia błoniasto-rozplemowego wykonano rebiopsję. Uzyskane wartości nie były znacząco różne od stwierdzanych w pierwszej biopsji (ok. 2%), co było związane z niedługim okresem czasu, jaki upłynął pomiędzy biopsjami. U jednego chorego wynosił on 15 miesięcy, a u drugiego 4 lata.

Podsumowując, mogę stwierdzić, iż wyniki moich badań okazały się, nawet w wartościach bezwzględnych, porównywalne z wynikami badań innych autorów. Mimo, iż zwykle używali oni odmiennych metod barwienia (najczęściej metody trójbarwnej wg Massona), a także innych metod pomiaru.

Nasilenie włóknienia śródmiąższowego uważa się za główny pozakłębuszkowy czynnik w rozwoju schyłkowej niewydolności nerek. Badania licznych autorów potwierdziły zależność wielu parametrów czynnościowych nerek od włóknienia śródmiąższowego [18, 19, 21, 22, 120, 121, 122]. Mechanizmy powodujące, że włóknienie śródmiąższowe prowadzi w końcu do niewydolności nerek nie zostały do końca poznane i bardzo wiele doniesień porusza ten temat, a różne teorie i możliwości zostały przedstawione we wstępie. Wzajemne zależności między zmianami śródmiąższowymi a nasileniem zmian obserwowanych w obrębie kłębuszków nerkowych także są przedmiotem wielu doniesień. W wielu z nich udało się wykazać brak związku

między nasileniem włóknienia śródmiąższowego a zmianami kłębuszkowymi [20, 22, 23, 27].

W badanej przeze mnie grupie we wszystkich typach glomerulopatii ujawniono zależności między wynikami pomiarów pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego a większością parametrów czynnościowych nerek. Jednym z najczęściej wymienianych czynników mających wpływ na rozwój schyłkowej niewydolności nerek w przebiegu przewlekłych glomerulopatii jest białkomocz. W przypadku glomerulopatii przebiegającej z wysoce selektywnym białkomoczem, jaką są zmiany minimalne (MCD, ang. *minimal change disease*, łac. *glomerulonephritis submicroscopica*) rozwija się zwykle przewlekła niewydolność nerek, a leczenie kortykosteroidami powoduje zmniejszenie białkomoczu i najprawdopodobniej dlatego nie dochodzi do uszkodzenia cewek i włóknienia śródmiąższowego. Dlatego uważa się, że w glomerulopatiach, w których uszkodzeniu kłębuszków nerkowych nie towarzyszy włóknienie śródmiąższowe z zanikiem cewek nie dochodzi do schyłkowej niewydolności nerek [21, 28, 112]. Bazzi i wsp. badali dużą grupę chorych z zespołem nerczycowym, w której rozpoznano histologicznie MCD, FSGS i glomerulopatię błoniastą. Autorzy udowodnili, że w przypadkach z wysoce selektywnym białkomoczem nasilenie uszkodzenia śródmiąższu było znacznie mniejsze, a klinicznie obserwowano całkowitą lub częściową remisję i brak progresji do przewlekłej niewydolności nerek [112].

Skutkiem wysokiego białkomoczu jest aktywacja komórek nabłonkowych cewek nerkowych, które zaczynają produkować różne mediatory. Modelem doświadczalnym posłużył się Eddy, który udowodnił zależność między poziomem białka w moczu a nasileniem uszkodzenia cewek i obecnością nacieków zapalnych [123]. W ostatnich latach ujawniono wiele z mechanizmów odpowiedzialnych za uszkodzenie śródmiąższu spowodowane białkomoczem. Albumina i inne białka są filtrowane przez kłębuszki do przesączu i następnie reabsorbowane przez komórki nabłonka cewek bliższych [124, 125]. W warunkach fizjologicznych niewielka ilość cząsteczek białka jest w bardzo wydajny sposób reabsorbowana na drodze endocytozy dzięki

kompleksowi receptorów megaliny i kubuliny, w związku z tym mocz jest praktycznie pozbawiony białka [126]. W przypadku uszkodzenia kłębuszków w przesączu pierwotnym znajduje się tak duża ilość białka, że nie mogą być one reabsorbowane ani degradowane w lizosomach [127]. W warunkach przeciążenia białkiem dochodzi do ekspresji mediatorów prozapalnych i warunkujących włóknienie, powoduje to obecność nacieków zapalnych i włóknienie śródmiąższowe [124, 127]. W procesie tym bierze udział wiele dróg metabolicznych powodujących pojawienie się chemokin, cytokin, różnych czynników wzrostu, białek chemotaktycznych dla monocytów, a także aktywację układu dopełniacza [124, 127]. Do najczęściej wymienianych cytokin prozapalnych i ułatwiających włóknienie należą: RANTES, MCP-1 (ang. monocyte chemoattractant protein-1), interleukina 8, endotelina, TGF-beta1 oraz angiotensyna II [125].

W moich badaniach uwzględniłam średni dobowy białkomocz w czasie biopsji oraz największy dobowy białkomocz po 2 latach obserwacji. Analiza zależności między tymi dwoma parametrami a nasileniem włóknienia śródmiąższowego dotyczyła całej badanej grupy, gdyż w przypadku nefropatii IgA, glomerulopatii błoniastej i zapalenia błoniasto-rozplemowego grupy te okazały się zbyt mało liczne dla porównań i testów statystycznych. Zależność między średnim dobowym białkomoczem a pomiarami pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego była bardzo silna, zarówno w analizie półautomatycznej ($r=0,91$, $p<0,001$), jak i w analizie automatycznej ($r=0,90$, $p<0,001$). Istotną korelację wykazałam także w przypadku najwyższego dobowego białkomoczu po 2 latach obserwacji w analizie półautomatycznej ($r=0,53$, $p<0,001$) oraz automatycznej ($r=0,57$, $p<0,001$). Podobne wyniki uzyskali Bazzi i wsp. w grupie FSGS oraz u chorych z glomerulopatią błoniastą [112], Widdams-Attoprs i wsp. w nefropatii IgA [28, 120], natomiast Kostadinova-Kunowska i wsp. oraz Danilewicz i wsp. w zapaleniu błoniasto-rozplemowym [118, 122].

Stężenie kreatyniny w surowicy krwi oraz klirens kreatyniny także należą do czynników związanych z nasileniem włóknienia śródmiąższowego.

Parametry te także oceniłam w całej badanej grupie uzyskując bardzo wysoką dodatnią korelację między stężeniem kreatyniny w surowicy krwi w dniu, w którym wykonano biopsję a włóknieniem śródmiąższowym w analizie półautomatycznej ($r=0,90$; $p<0,001$) i automatycznej ($r=0,92$; $p<0,001$). Podobne zależności ujawniłam w odniesieniu do stężenia kreatyniny w surowicy krwi po 2 latach obserwacji, w analizie półautomatycznej ($r=0,90$; $p<0,001$) i automatycznej ($r=0,92$; $p<0,001$). Także bardzo wysoką ujemną korelację zaobserwowałam między poziomem włóknienia śródmiąższowego a wartościami klirensu kreatyniny w dniu, w którym wykonano biopsję w analizie półautomatycznej ($r=-0,84$; $p<0,001$) oraz w analizie automatycznej ($r=-0,84$; $p<0,001$). Po 2 latach obserwacji klirens kreatyniny korelował z nasileniem włóknienia śródmiąższowego po zastosowaniu zarówno analizy półautomatycznej jak i automatycznej ($r=-0,84$; $p<0,001$). Podobne zależności odnotowywali inni autorzy [21, 22, 23, 24, 26, 69, 79, 90].

Ze względu na fakt, że poza chorymi z FSGS pozostałe grupy były zbyt małe liczebnie postanowiłam porównać wyżej wymienione parametry kliniczne w odniesieniu do grupy chorych, u których rozwinęła się schyłkowa niewydolność nerek z tymi, u których przebieg choroby był bardziej korzystny. W tej ostatniej grupie znaleźli się pacjenci z remisją, poprawą stanu klinicznego, brakiem poprawy oraz z progresją. Różnice między tymi dwiema grupami klinicznymi okazały się statystycznie istotne w odniesieniu do średniego dobowego białkomoczu, stężenia kreatyniny w surowicy krwi oraz klirensu kreatyniny w dniu wykonania biopsji ($p<0,001$). Podobnie po 2 latach obserwacji najwyższy dobowy białkomocz, stężenie kreatyniny w surowicy krwi i klirens kreatyniny okazały się statystycznie istotnie różne w obu wymienionych powyżej grupach klinicznych (odpowiednio $p=0,04$; $p<0,001$; $p<0,001$).

Biorąc pod uwagę uzyskane przeze mnie wyniki można stwierdzić, że badanie morfometryczne jest istotnym uzupełnieniem rozpoznania histopatologicznego. Uzyskujemy dzięki niemu obiektywną informację o znaczeniu rokowniczym, a mianowicie ocenę nasilenia włóknienia

śródmiaższowego. Przeprowadzona przeze mnie analiza danych klinicznych jest bardzo cenna także z powodu długiego okresu obserwacji chorych. Nie znalazłam w dostępnym piśmiennictwie prac, które uwzględniałyby zależność między nasileniem włóknienia śródmiaższowego a końcowym efektem leczenia i naturalnego przebiegu w różnych glomerulopatiach.

Analiza danych badań morfometrycznych biopsji nerek wykonanych przez innych autorów, których wyniki przedstawiłam w niniejszym omówieniu, wskazuje, że uzyskane wartości mogą się dość znacznie różnić. Dlatego każda pracownia przed wdrożeniem badań morfometrycznych do diagnostyki patomorfologicznej powinna stworzyć własny układ odniesienia. Powinien on obejmować wyniki pomiarów uzyskane w grupie kontrolnej (bez zmian patologicznych w śródmiaższu) oraz w różnych grupach glomerulopatii. Ze względu na fakt stosowania różnych metod morfometrycznych służących do pomiarów nasilenia włóknienia śródmiaższowego oraz różnych metod barwień [18, 21, 22, 69, 75, 90, 111, 113, 117, 118, 120, 122] wyżej wymieniony układ odniesienia będzie wiarygodnym materiałem dla porównań przede wszystkim w danej pracowni. Jednak współpracując z tym samym zespołem klinicystów można wspólnie wyciągnąć wnioski rokownicze.

WNIOSKI

1. Nieistotne statystycznie różnice między analizą półautomatyczną i automatyczną pomiarów nasilenia włóknienia śródmiąższowego nasuwają wniosek, że dla oceny zmian wystarczy zastosowanie metody automatycznej, ponieważ jest ona dużo szybsza w użyciu.
2. Dla zobiektywizowania oceny morfologicznej zmian śródmiąższowych w biopsji nerek wskazana byłaby każdorazowa ocena morfometryczna.
3. Uzyskane wyniki oceny ilościowej włóknienia śródmiąższowego nerek wskazują na związek obrazu klinicznego kłębkowych zapaleń nerek z nasileniem zmian śródmiąższowych.
4. Z uwagi na fakt, że zmiany śródmiąższowe są nierównomiernie rozłożone, warunkiem uwiarygodnienia wyników pomiarów jest uzyskanie dostatecznej ilości materiału biopsyjnego.
5. Poziom nasilenia włóknienia śródmiąższowego może być wskazówką w ocenie odległego rokowania i prognozowaniu progresji.
6. Stwierdzone niekiedy niewielkie nasilenie zmian kłębuszkowych w porównaniu z nasileniem włóknienia śródmiąższowego może zależeć między innymi od faktu, że badanie świetlno-mikroskopowe niedostatecznie ujawnia obecność sklerotyzacji kłębuszków. Wskazuje to na konieczność zabezpieczenia materiału do badania elektronowo-mikroskopowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Cook H.: The origin of renal fibroblasts and progression of kidney disease. *Am. J. Pathol.* 2010, 176: 22-24.
2. Strutz F., Zeisberg M.: Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006, 11: 2992-2998.
3. Bohle A., Wehrman M., Mackensen-Haen S., von Giese H., Mickeler E., Xiao T., Muller C., Muller G.: Pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulonephropathies. *Nephrol. Dial. Transplant. Suppl.* 1994, 3: 4-12.
4. Li M., Liu B.: Epithelial to mesenchymal transition in the progression of tubulointerstitial fibrosis. *Chin. Med. J.* 2007, 120: 1925-1930.
5. Liu X., Chapman G., Peyton J., Schafer I., Durante W: Antiapoptotic action of carbon monoxide on cultured vascular smooth muscle cells. *Exp. Biol. Med.*, 2003, 5: 572-575.
6. Klahr S., Morrissey J.: Progression of chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 41: S3-S7.
7. Owen W. Jr: Patterns of care for patients with chronic kidney disease in the United States: Dying for improvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14: S76-S80.
8. Brenner B., Cooper M., de Zeeuw D., Keane W., Mitch W., Parving H., Remuzzi G., Snapinn S., Zhang Z., Shahinfar S.: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl. J. Med.* 2001, 345: 861-869.
9. Liu Y.: Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15: 1-12
10. Pirani C.: Evaluation of kidney specimens. W: Renal pathology with clinical and functional correlations. Tisher C., Brenner B. eds, J. B. Lippincott Company Philadelphia 1989, 29.
11. Bonsib S.: Renal anatomy and histology. W: Heptinstall's pathology of the kidney. Jennette J., Olson J., Schwartz M., Silva F., eds, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007: 58-62.
12. Clapp W.: Adult kidney. W: Sternberg S., ed. Histology for the pathologist. New York, Raven Press, 1992: 677.

13. Stovens A., Lowe J.: *Histologia*. Tłumaczenie opracowane pod red. M. Zabla. Brema, Wyd. Med. Słowiński Verlag, 1994: 271-303.
14. Rodemann H., Muller G.: Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am. J. Kidney Dis* . 1991, 17: 684-686.
15. Strutz F., Muller G.: Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant*. 2006, 12: 3368-3370.
16. Takashi-Iwanaga H.: The three-dimensional cytoarchitecture of the interstitial tissue of the rat kidney. *Cell Tissue Res*. 1991: 264-269.
17. Hashizume T., Imayama S., Hori Y.: Scanning electron microscopic study on dendritic cells and fibroblasts in connective tissue. *J Electron Microsc*. 1992, 41: 414-416.
18. Mackensen-Haen S., Grund K., Schirmeister J., Bohle A.: Impairment of the glomerular filtration rate by glomerular and interstitial factors in membranoproliferative glomerulonephritis with normal serum creatinine concentration. *Virchows Arch. A Path. Anat. Histol*. 1979, 382: 11-19.
19. Risdon R., Sloper J., Wardener H.: Relationship between renal function and histological changes found in renal biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 1968, 2: 363-370.
20. Roberts I., Burrows C., Shanks J., Venning M., McWilliam L.: Interstitial myofibroblasts: predictors of the progression in membranous nephropathy. *J. Clin. Path*. 1997, 50: 123-127.
21. Bohle A., Glomb D., Grund K., Mackensen S: Correlation between relative interstitial volume of the renal cortex and serum creatinine concentration in minimal changes with nephrotic syndrome and in focal sclerosing glomerulonephritis. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol*. 1977, 25: 221-232.
22. Bohle A., Bader R., Grund K., Mackensen S., Neunheffer J.: Serum creatinine concentration and renal interstitial volume. Analysis of correlation in endocapillary (acute) glomerulonephritis and in moderately severe mesangio-proliferative glomerulonephritis. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol*. 1977, 31: 87-96.
23. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: Idiopathic membranous glomerulonephritis. A quantitative study of glomerular and interstitial lesions. *Pol. J. Pathol*. 1995, 46: 173-177.

24. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: A quantitative analysis of primary proliferative mesangial glomerulonephritis (PMGN) and diffuse form of idiopathic IgA nephropathy (IgAN). Variants of the same morphological process? *Pol. J. Pathol.* 1996, 47: 73-78.
25. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: A primary IgA nephropathy. Contrasting morphometric insight into glomerular and interstitial changes in younger and elderly patients. *Pol. J. Pathol.* 1997, 48: 173-178.
26. Freese P., Norden G., Nyberg G.: Morphologic high-risk factors in IgA nephropathy. *Nephron* 1998, 79: 420-425.
27. Woźniak A., Salwa-Żurawska W., Kaczmarek E.: Is there any relationship between renal fibrosis and early glomerular sclerosis? Results of light and electron microscopic morphometric studies. XV Congress of Polish Society Pathologist. *Pol J Pathol* 2001, 52, 101 (abs).
28. Widstam-Attorps U., Berg U., Bohman S., Lefvert A.: Proteinuria and renal function in relation to renal morphology. A clinicopathological study of IgA nephropathy at the time of kidney biopsy. *Clin. Nephrol.* 1992, 38: 245-253.
29. Katafuchi R., Takebayashi S., Taguchi T., Harada T.: Structural-functional correlations in serial biopsies from patients with glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 1987, 28: 169-173.
30. Tomasek J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 3: 349 -363.
31. Qi W., Chen X., Poronnik P., Pollock C.: The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006, 38: 1-5.
32. Kalluri R., Zeisberg M.: Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6: 392-401.
33. Iwano M., Plieth D., Danoff T., Xue C., Okada H., Neilson E.: Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2002, 110: 341-50.
34. Kriz W., Kaissling B., Le Hir M.: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J. Clin. Invest.* 2011, 121: 468-474.
35. Yang J., Liu Y.: Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2001, 159: 1465-1475.

36. Yang J., Shultz R., Mars W., Wegner R., Li Y., Dai C., Nejak K., Liu Y.: Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J. Clin. Invest.* 2002, 110: 1525-1538.
37. Zeisberg M., Hanai J., Sugimoto H., Mammoto T., Charytan D., Strutz F., Kalluri R.: BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* 2003, 9: 964-968.
38. Strutz F., Okada H., Lo C., Danoff T., Carone R., Tomaszewski J., Neilson E.: Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell Biol.* 1995, 130: 393-405.
39. Koesters R., Kaissling B., Lehir M., Picard N., Theilig F., Gebhardt R., Glick A., Hähnel B., Hosser H., Gröne H., Kriz W.: Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 2010, 177: 632-643.
40. Horster M., Braun G., Huber S.: Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol. Rev.* 1999, 79: 1157-1191.
41. Ng Y., Huang T., Yang W., Chen Z., Yang A., Mu W., Nikolic-Paterson D., Atkins R., Lan H.: Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* 1998, 54: 864-876.
42. Kalluri R., Weinberg R.: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009, 119: 1420-1428.
43. Zeisberg M., Neilson E.: Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010, 21: 1819-1834.
44. Fan J., Ng Y., Hill P., Nikolic-Paterson D., Mu W., Atkins R., Lan H.: Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int.* 1999, 56: 1455-1467.
45. Zeisberg M., Strutz F., Muller G.: Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J. Nephrol.* 2000, 13: S111-S120.
46. Picard N., Baum O., Vogetseder A., Kaissling B., Le Hir M.: Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem. Cell Biol.* 2008, 130: 141-155.

47. Strutz F., Renziehausen A., Dietrich M., Amin J., Becker V., Heeg M., Rastaldi M., Muller G.: Cortical fibroblast culture from human biopsies. *J. Nephrol.* 2001,14: 190-197.
48. Rodemann H., Muller G., Knecht A., Norman J., Fine L.: Fibroblasts of rabbit kidney culture I. Characterization and identification of cell-specific markers. *Am. J. Physiol.* 1991, 261: 283-291.
49. Grande M., López-Novoa J.: Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009, 5: 319-328.
50. Lin S., Kisseleva T., Brenner D., Duffield J.: Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am. J. Pathol.* 2008, 173:1617-1627.
51. Faulkner J., Szczykalski L., Springer F., Barnes J.: Origin of interstitial fibroblasts in an accelerated model of angiotensin II-induced renal fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2005, 167:1193-1205.
52. Wiggins R., Goyal M., Merritt S., Killen P.: Vascular adventitial cell expression of collagen I messenger ribonucleic acid in anti-glomerular basement membrane antibody-induced crescentic nephritis in the rabbit. *Lab Invest.* 1993, 68: 557-565.
53. Barnes V., Musa J., Mitchell R., Barnes J.: Expression of embryonic fibronectin isoform EIIIA parallels alpha smooth muscle actin in maturing and diseased kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 1999, 47: 787-798.
54. Humphreys B., Lin S., Kobayashi A., Hudson T., Nowlin B., Bonventre J., Valerius M., McMahon A., Duffield J.: Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2010, 1: 85-97.
55. Roufosse C., Bou-Gharios G., Prodromidi E., Alexakis C., Jeffery R., Khan S., Otto W., Alter J., Poulson R., Cook H.: Bone marrow-derived cells do not contribute significantly to collagen I synthesis in a murine model of renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17:775-782.
56. Vacca L.: Laboratory manual of histochemistry. Raven Press, New York 1985, 327-328, 385-386, 407-408, 429-430.
57. Schwartz M.: Membranous Glomerulonephritis. W: Heptinstall's Pathology of the kidney. Jennette J., Olson J., Schwartz M., Silva F., eds, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007, 205-242.

58. Hall B., Ianosi-Irimie M., Javidian P., Chen W., Ganesan S., Foran D.: Computer assisted assessment of the human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical assay in image histologic sections using a membrane isolation algorithm and quantitative analysis of positive controls. *BMC Med. Imag.* 2008, 8: 11-16.
59. Masmoudi H., Hewitt S., Petrick N., Myers K., Gavrieldes M.: Automated quantitative assessment of HER-2/neu immunohistochemical expression in breast cancer. *IEEE Trans Med Imaging.* 2009, 28: 916-919.
60. Turashvili G., Leung S., Turbin D., Montgomery K., Gilks B., Wesr R., Carrier M., Huntsman D., Aparicio S.: Inter-observer reproducibility of HER2 immunohistochemical assessment and concordance with fluorescent in situ hybridization (FISH): pathologist assessment compared to quantitative image analysis. *BMC Cancer* 2009, 9: 165-166.
61. Sharangpani G., Joshi A., Porter K., Keyhani S., Morrison C., Basu A., Gholap G., Gholap A., Barsky S.: Semi-automated imaging system to quantitative Her-2/neu membrane receptor immunoreactivity in human breast cancer. *Cytometry A.* 2007, 71: 273-275.
62. Alamartine E., Sauron C., Laurent B., Sury A., Seffert A., Mariat C.: The use of the Oxford classification of IgA nephropathy to predict renal survival. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011, 6: 2384-2388.
63. Herzenberg A., Fogo A., Reich H., Troyanov S., Bavbek N., Massat A., Hunley T.: Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2011, 80: 310-317.
64. Sørensen H.: Quantitative studies of the renal corpuscles I: Intraglomerular, interglomerular and interfocal variation in the normal kidney. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1972, 80: 115-119.
65. Brun C., Olsen T., Steen R., Sørensen A.: Renal biopsy in rheumatoid arthritis. *Nephron* 1965, 2: 65-69.
66. Idaka K., McCoy J., Kimmelstiel P.: The glomerular mesangium. A quantitative analysis. *Lab. Invest.* 1968, 19: 573-577.
67. Wehner H.: Stereologische untersuchungen am mesangium normaler menschlicher nieren. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* 1968, 344: 286-289.
68. Bader R., Bader H., Grund K., Mackensen-Haen S., Christ H., Bohle A.: Structure and function of the kidney in diabetic glomerulosclerosis. Correlations between morphological and functional parameters. *Path. Res. Pract.* 1980, 167: 204-216.

69. Mackensen-Haen S., Eiselle R., Bohle A.: Contribution on the correlation between morphometric parameters gained from the renal cortex and renal function in IgA nephritis. *Lab. Invest.* 1988, 59: 239-242.
70. Milewski C., Konig M., Gise H., Bohle A.: Clinical and morphological aspects of nephrotic syndrome in perimembranous, focally sclerosing and membrano-proliferative glomerulonephritis. *Klin. Wschr.* 1983, 61: 493-495.
71. Riemenschneider T., Mackensen Haen S., Christ H., Eiselle R., Bohle A.: Correlation between endogenous creatinine clearance and relative interstitial volume of the renal cortex in patients with diffuse membranous glomerulonephritis having a normal serum creatinine concentration. *Lab. Invest.* 1980, 43: 145-148.
72. Zieliński W., Strzelecki M.: Komputerowa analiza obrazu biomedycznego. Wstęp do morfometrii i patologii ilościowej. Wydawnictwo Naukowe PWN 2002.
73. Mofidi R., Walsh R., Ridgway P., Crotty T., McDermott E., Keaveny T., Duffy M., Hill A., O'Higgins N.: Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2003, 29: 20-24.
74. Leong F., Brady M., McGee J.: Correction of uneven illumination (vignetting) in digital microscopy images. *J. Clin. Path.* 2003, 55: 619-621.
75. Diaz-Encarnacion M., Griffin M., Slezak J., Bergstralh E., Stregall M., Velosa J., Grande J.: Correlation of quantitative digital image analysis with the glomerular filtration rate in chronic allograft nephropathy. *Am. J. Transpl.* 2003, 4: 248-256.
76. Bakker R., Koop K., Sijpkens I., Eikmans M., Bajema I., De Heer E., Bruijn J., Paul L.: Early interstitial accumulation of collagen type I discriminates chronic rejection from chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14: 2142-2149.
77. Chea S., Lee K.: TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition in auto-somal dominant polycystic kidney disease. *Yonsei Med. J.* 2009, 50: 105-111.
78. Shimizu H., Maruyama S., Yuzawa Y., Kato T., Miki Y., Suzuki S., Sato W., Morita Y., Maruyama H., Egashira K., Matsuo S.: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14: 1496-1505.

79. Liu H., Liu F., Peng Y., Liu Y., Li L., Tu X., Cheng M., Xu X., Chen X., Ling G., Sun L: Role of mast cells, stem cell factor and protease-activated receptor-2 in tubulointerstitial lesions in IgA nephropathy. *Inflamm. Res.* 2010, 59: 551-559.
80. Cukierski WJ, Qi X, Foran DJ: Moving beyond color: The case for multispectral imaging in bright fields pathology. *Proc. IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging* 2009, 5193251: 1111-1114.
81. Pirrotte P., Muterer J.: Image gallery database: multi-user image management software. *Microscopy and Analysis*. 2004, 18: 13-15, www.soft-imaging-web.de, www.mediacy.com, www.wadsworth.org.
82. Pham N., Morrison A., Schwock J., Viel-Rone S., Lakovlev V., Tsao M., Ho J., Hedley D.: Quantitative image analysis of immunohistochemical staining using a CMYK color model. *Diagn. Pathol.* 2007, 8: 8-10.
83. Castleman K.: Concepts in imaging and microscopy: color image processing for microscopy. *Biol. Bull.* 1998, 194: 100-107.
84. Katoh C., Nakada K., Kishimoto R., Ogawa H., Itoh K., Furudate M.: Quantitative image feature analysis of echographic textures using the normalized first moment of power spectra: comparison of normal thyroid with chronic thyroiditis. *Nippon Igaku Hoshasen Gakai. Zasshi.* 1995, 55: 902-907.
85. Lehr H., Van Der Loos C., Teeling P., Gown A.: Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 1999, 47: 119-126.
86. Lehr H., Mankoff D., Corwin D., Santeusanio G., Gown A.: Application of Photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 1999, 47: 1559-1565.
87. Amenabar J., Martins G., Cherubini K., Figueiredo M.: Comparison between semiautomated segmentation and manual point-counting methods for quantitative analysis in histological sections. *J. Oral. Sci.* 2006, 48: 139-143.
88. Boyce R., Dorph-Petersen K., Lyck L., Gunderswn H.: Design-based stereology. Introduction of basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol. Pathol.* 2010, 38: 1011-1013.
89. Bartels P., Weber J., Paplanus S., Graham A.: Detection of diagnostic clues in statistical histometry. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1987, 9: 355-368.

90. Danilewicz M.: Ocena przydatności komputerowych badań histomorfometrycznych do obiektywizacji rozpoznania wybranych postaci glomerulopatii pierwotnych. Rozprawa habilitacyjna, Łódź 1994, 11-22.
91. Weibel E.: *Stereological Methods. Vol 1. Practical methods for biological morphometry.* Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1979, 235.
92. Krajewska M., Smith L., Rong J., Huang X., Hyer M., Zeps N., Iacopetta B., Linke S., Olson A., Reed J., Krajewski S.: Image analysis algorithms for immunohistochemical assessment to cell death events and fibrosis in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 2009, 57: 649-653.
93. Lejeune M., Jaen J., Pons L., Lopez C., Salvado M., Bosch R., Garcia M., Escrivá P., Baucells J., Cugat X., Alvaro T.: Quantification of diverse subcellular immunohistochemical markers with clinico-biological relevancies: validation of a new computer-assisted image analysis procedure. *J. Anat.* 2008, 212: 868-871.
94. Ramer N., Wu H., Sabo E., Ramer Y., Emanuel P., Orta L., Burstein D.: Prognostic value of quantitative p63 immunostaining in adenoid cystic carcinoma of salivary gland assessed by computerized image analysis. *Cancer* 2010, 116: 77-81.
95. Shamir L., Delaney J., Orlov N., Eckley D., Goldberg I.: Pattern recognition software and techniques for biological image analysis. *PLoS Comput. Biol.* 2010, 11: e10000974.
96. Rexhepaj E., Drennan D., Holloway P., Kay E., McCann A., Landberg G., Duffy M., Jirstrom K., Gallagher W.: Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008, 10: 89-91.
97. Johansson A., Visse E., Widegren B., Sjorgen H. O., Siesjo P.: Computerized image analysis as a tool to quantify infiltrating leukocytes: a comparison between high- and low-magnification images. *J. Histochem. Cytochem.* 2001, 49: 1073-1079.
98. Zieliński K.: *Zarys zasad ilościowej diagnostyki patomorfologicznej.* Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź, 1994.
99. Servais A., Meas-Yedid V., Morelon E., Strupler M., Schanne-Klein M., Legendre C., Olivo-Marin J., Thervet E.: Recent approaches of quantification of interstitial fibrosis in renal transplantation. *Med. Sci.* 2009, 25: 945-950.

100. Lopez C., Lejeune M., Escriva P., Bosch R., Salvado M., Pons L., Baucells J., Cugat X., Alvaro T., Jaen J.: Effects of image compression on automatic count of immunohistochemically stained nuclei in digital images. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 2008, 15: 794-798.
101. Barrionuevo W., Filho E., Baganto V.: Enhanced visualization of histological samples with an adjustable RGB contrast system with application for tissue used in photodynamic therapy. *Microsc. Res. Tech.* 2008, 71: 403-408.
102. Joshi A., Sharangpani G., Porter K., Keyhani S., Morrison C., Basu A., Gholap G., Gholap A., Barsky S.: Semi-automated imaging system to quantitative Her-2/neu membrane receptor immunoreactivity in human breast cancer. *Cytometry* 2007, 71: 273-275.
103. Kayser K., Gortler J., Metze K., Goldmann T., Vollmer T., Mireskandari M., Kosjerina Z., Kayser G.: How to measure image quality in tissue based diagnosis (diagnostic surgical pathology). *Diagn. Pathol.* 2008, 1: S11-S13.
104. Stetkiewicz J.: Zastosowanie badań morfometrycznych w ocenie toksycznego działania substancji chemicznych. *Studia i materiały monograficzne. Instytut Medycyny Pracy.* 1992, 39,11
105. Ong S., Jin X., Jayasooriah, Sinniah R: Image analysis of tissue sections. *Comput. Biol. Med.* 1996, 26: 269-272.
106. Churg J., Bernstein J., Glassock R.: Renal Disease Classification and Atlas of Glomerular Disease. Igacu-Shoin, Tokyo, New York 1995, 45-62, 85-105.
107. Antonovych T., Mostofi F.: Atlas of kidney biopsies. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C. 1980.
108. Schwartz M.: Focal Segmental Glomerulosclerosis. W: Heptinstall's pathology of the kidney. Jennette J., Olson J., Schwartz M., Silva F., eds, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia 2007, 170-172.
109. Haas M.: IgA Nephropathy and Henoch-Schoenlein Purpura Nephritis. W: Heptinstall's pathology of the kidney. Jennette J., Olson J., Schwartz M., Silva F., eds, Lippincott, Williams & Wilkins Philadelphia 2007: 423-474.
110. Munro B., Ellis B.: Statistical methods for health care research. J. B. Lippincott Company, fifth edition, Philadelphia 2004, 173-192.

111. Horvatic I., Ljubanovic D., Bulimbasic S., Knotek M., Prkacin I., Tisljar M., Galesic K.: Prognostic significance of glomerular and tubulointerstitial morphometry in idiopathic membranous nephropathy. *Pathol. Res. Pract.* 2012, 208: 662-667.
112. Bazzi C., Petrini C., Rizza V., Arrigo G., D'Amigo G.: A modern approach to selectivity of proteinuria and tubulointerstitial damage in nephritic syndrome. *Kidney Int.* 2000, 58: 1732-1741.
113. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: Immunohistochemical analysis of the interstitial mast cells in acute rejection renal allografts. *Med. Sci. Monit.* 2004, 10: 151-156.
114. Wągrowaska-Danilewicz M. Danilewicz M. Stasikowska O.: CC chemokines and chemokine receptors in IgA nephropathy (IgAN) and in non-IgA mesangial proliferative glomerulonephritis (MesProGN). the immunohistochemical comparative study. *Pol. J. Pathol.* 2005, 56:121-126.
115. Stein-Oakley A., Maguire J., Dowling J., Perry G., Thomsom N.: Altered expression of fibrogenic growth factors in IgA nephropathy and focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1997, 51:195-204.
116. Tomioka M., Hiromura K., Sakairi T., Takeuchi S., Maeshima A., Kaneko Y., Kuroiwa T., Takeuchi T., Nojima Y.: Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology* 2010, 15: 568-574.
117. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: Quantitative analysis of interstitial mast cells in lupus and non-lupus membranous glomerulopathy. *Pol. J. Pathol.* 2001, 52: 211-217.
118. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: Quantitative analysis of the interstitial mast cells in idiopathic mesangiocapillary glomerulonephritis type I. *Nefrologia*, 2001, 21: 253-259.
119. Otsubo S, Nitta K, Uchida K, Yumura W, Nihei H.: Mast cells and tubulointerstitial fibrosis in patients with ANCA-associated glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol.* 2003,7:41-47.
120. Danilewicz M., Wągrowaska-Danilewicz M.: Tubular NF- κ B is overexpressed in proteinuric patients with IgA nephropathy. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2012, 50: 93-98.
121. Lee H., Koh H: Nature of progressive glomerulosclerosis in human membranous nephropathy. *Clin. Nephrol.* 1993, 39: 7-12.

122. Kostadinova-Kunovska S., Petrusevska G., Jovanović R., Grcvska L., Polenaković M., Dzekova P., Nikolov I., Sikole A., Grozdanovski R., Polenaković M.: Histomorphometric analysis of fibrosis in the renal interstitial compartment. *Prilozi*. 2005, 26:51-59.
123. Eddy A.: Interstitial nephritis induced by protein-overload prote-inuria. *Am. J. Pathol.* 1989, 135: 719-733.
124. Gorriz J., Martinez-Castelao A.: Proteinuria: detection and role in native renal progression. *Transplant. Rev.* 2012, 26: 3-13.
125. Ziyadeh F., Wolf G.: Pathogenesis of the podocypathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Current Daibetes Reviews*. 2008, 4:39-45.
126. Nielsen R., Christensen I.: Proteinuria and events beyond the slit. *Pediatric Nephrology*. 2010, 25: 813-822.
127. Toblli J., Bevione P., Di Genaro E., Madalena L., Cao G., Angerosa M.: Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications. *Int. J. Nephrol.* 2012: 546039.

STRESZCZENIE

Włóknienie śródmiąższowe z zanikiem cewek towarzyszy wszystkim przewlekłym glomerulopatiom, począwszy od zapaleń kłębuszkowych pierwotnych i wtórnych, poprzez glomerulopatie wrodzone, glomerulopatie związane z chorobami metabolicznymi i nadciśnieniem. Powszechnie uważa się, że pogorszenie funkcji nerek jest uwarunkowane głównie stopniem nasilenia zmian śródmiąższowych, a przede wszystkim włóknienia śródmiąższu związanego z odkładaniem macierzy pozakomórkowej. Tradycyjnie stosowana wzrokowa ocena preparatów mikroskopowych a także barwień histochemicznych ujawniających włóknienie śródmiąższowe jest oceną subiektywną. W tej sytuacji konieczne wydaje się wdrożenie metod obiektywizacji wyników oceny preparatów mikroskopowych.

Celem moich badań było: zastosowanie metod komputerowej analizy obrazu pozwalających na obiektywną ocenę nasilenia włóknienia śródmiąższowego, porównanie wartości uzyskanych metodą półautomatyczną i automatyczną, określenie pracochłonności obu metod morfometrycznych analizy nasilenia włóknienia śródmiąższowego, pod kątem możliwości ich zastosowania w codziennej diagnostyce biopsji nerek oraz odniesienie uzyskanych wyników pomiarów włóknienia śródmiąższowego do stanu klinicznego chorych (w czasie biopsji, po dwóch latach obserwacji i po 10 latach obserwacji).

Przedmiotem analizy były wyniki badań morfologicznych świetlnomikroskopowych, elektronowo-mikroskopowych, immunofluorescencyjnych i morfometrycznych biopsji nerek wykonanych u 39 chorych z różnymi pierwotnymi glomerulopatiami. Największą grupę (22 przypadki) stanowili chorzy, u których rozpoznano ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS). W kolejnej grupie znalazło się 6 chorych z rozpoznaniem nefropatii IgA, u których stwierdzono klasę IV, tzn. zmiany rozlane, rozplemowe. Następną grupę stanowili chorzy z glomerulopatią błoniastą (6

przypadków). Badaniu poddano także biopaty 5 chorych z rozpoznaniem zapaleniem błoniasto-rozplemowym.

Grupę kontrolną (20 przypadków) stanowiły fragmenty nerek osób bez schorzeń nerek, u których usunięto narząd z powodu urazów komunikacyjnych. Dane kliniczne w żadnym z przypadków grupy kontrolnej nie ujawniały istnienia choroby nerek.

We wszystkich badanych przypadkach skrawki parafinowe zabarwiono czerwienią Syriusza. Badania morfometryczne wykonano zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej. We wszystkich przypadkach fotografowano (przy powiększeniu obiektywu x 40) za pomocą kamery firmy OLYMPUS (DP12) i zapisywano na dysku komputera obrazy całego biopatu. W kolejnym etapie przeprowadzono analizę półautomatyczną przy pomocy programu ImageJ oraz analizę automatyczną z zastosowaniem oprogramowania Nerka 1.0b. W całej badanej grupie średnia wartość nasilenia włóknienia śródmiąższowego uzyskana w analizie półautomatycznej wyniosła $31,52 \pm 5,78\%$. Po przeprowadzeniu analizy automatycznej średnia wartość wyniosła $31,83 \pm 5,78\%$. Porównanie wyników uzyskanych przy użyciu obydwu metod wykazało, że nie ma istotnej różnicy między analizą półautomatyczną a automatyczną ($p=0,06$).

W całej badanej grupie porównano wyniki pomiarów morfometrycznych pola powierzchni włóknienia śródmiąższowego z wartościami średniej dobowej utraty białka w czasie biopsji, stężenia kreatyniny w surowicy krwi oraz klirensiem kreatyniny. Zarówno w analizie półautomatycznej, jak i automatycznej uzyskano silną zależność pomiędzy nasileniem włóknienia a wymienionymi wyżej parametrami klinicznymi.

Zanotowano statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą chorych ze schyłkową niewydolnością nerek a pozostałymi pacjentami w odniesieniu do odsetka włóknienia śródmiąższowego zarówno w analizie półautomatycznej, jak i automatycznej ($p<0,001$). Nasilenie włóknienia śródmiąższowego u chorych, którzy osiągnęli remisję ($21,57 \pm 4,16\%$ w analizie półautomatycznej i $21,86 \pm 5,27\%$ w analizie automatycznej) także różnił się w stosunku do tych, u

których wystąpiła poprawa stanu klinicznego (odpowiednio $26,33 \pm 3,06\%$; $27,00 \pm 2,65\%$) czy progresja choroby ($28,67 \pm 5,03\%$; $29,00 \pm 4,00\%$). Wartość odsetka włóknienia śródmiąższowego, powyżej której przebieg choroby był gorszy wyniosła 30%, jednak nie można było ocenić statystycznej istotności tej wartości ze względu na małą liczebność grupy z bardziej korzystnym przebiegiem klinicznym.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały nieistotne statystycznie różnice między analizą półautomatyczną i automatyczną pomiarów nasilenia włóknienia śródmiąższowego co przemawia za zastosowaniem metody automatycznej, ponieważ jest ona dużo szybsza w użyciu. Dla zobiektywizowania oceny morfologicznej zmian śródmiąższowych w biopsji nerek wskazana byłaby każdorazowa ocena morfometryczna.

Uzyskane wyniki oceny ilościowej włóknienia śródmiąższowego nerek, pomimo pewnych różnic z cytowanymi w piśmiennictwie, potwierdziły zależność wyników badań klinicznych (średni dobowy białkomocz, stężenie kreatyniny w surowicy krwi i klirens kreatyniny) od nasilenia zmian śródmiąższowych. Z uwagi na fakt, że zmiany śródmiąższowe są nierównomiernie rozłożone, warunkiem uwiarygodnienia wyników pomiarów jest uzyskanie dostatecznej ilości materiału biopsyjnego.

SUMMARY

Interstitial fibrosis with tubular atrophy accompanies all chronic glomerulopathies: primary and secondary, congenital glomerulopathies and lesions related to metabolic diseases and hypertension. The traditional evaluation of light microscopic sections and histochemical reactions is subjective. There is a necessity to use objective methods for evaluation of tubulo-interstitial fibrosis.

The aim of my study was: 1) to apply the computer image analysis permitting an objective assessment of interstitial fibrosis, 2) to compare the value of the semi-automated and the automated method of computer image analysis, 3) to estimate the usefulness of both methods in everyday nephropathologists practice, 4) to refer the results of measurements of tubulo-interstitial fibrosis to clinical findings (in the time of the biopsy, after two years and after 10 years of observation).

The material consisted of light-, electron-, fluorescent microscopic and morphometric results of 39 renal biopsies with different primary glomerulopathies. In all cases clinical parameters were also analyzed. The largest group (22 cases) consisted of patients with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). The next group (6 cases) stated patients with IV class of IgA nephropathy. Membranous glomerulopathy was diagnosed in 6 cases and membranoproliferative glomerulonephritis in 5 patients. The control group consisted of 20 cases. Fragments of normal kidneys, which were removed due to injury, served as control. In both groups morphometric study was performed.

Paraffin block sections were stained Sirius red and photographed using DP12 Olympus camera connected with microscope (at magnification 400x). Then computer semi-automated analysis using ImageJ program was performed. Automated digital image analysis has been performed thanks Nerka 1.0.b algorithm thresholding RGB images.

Morphometric studies showed 31.52 ± 5.78 % average percentage of tubulo-interstitial fibrosis in semi-automated method and 31.83 ± 5.78 % using automated

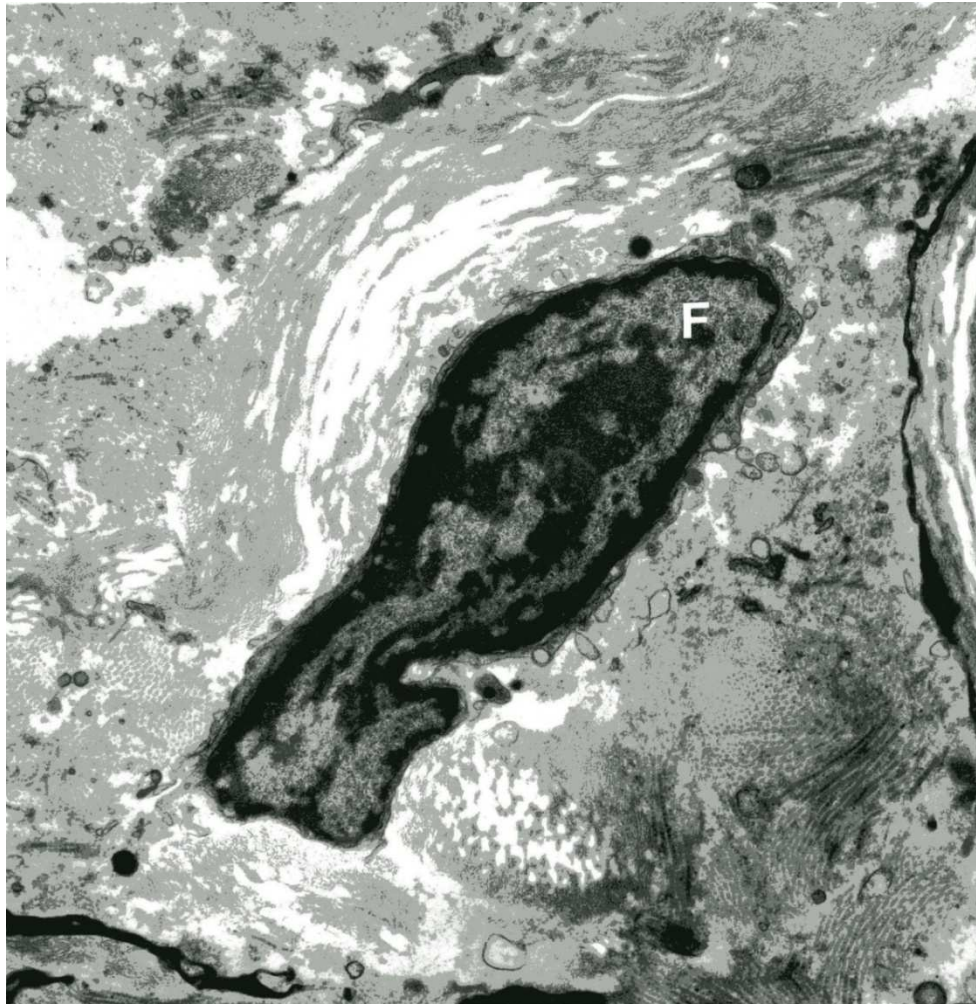
analysis. The comparison revealed no statistically significant difference between semi-automated and automated method ($p = 0,06$).

Results of morphometric studies have been correlated with average proteinuria (per 24 hours), creatinine level and creatinine clearance in the time of diagnosis and during follow-up (2 years, 10 years). Statistically significant correlations were found both using semi-automated and automated digital analysis ($p < 0,001$).

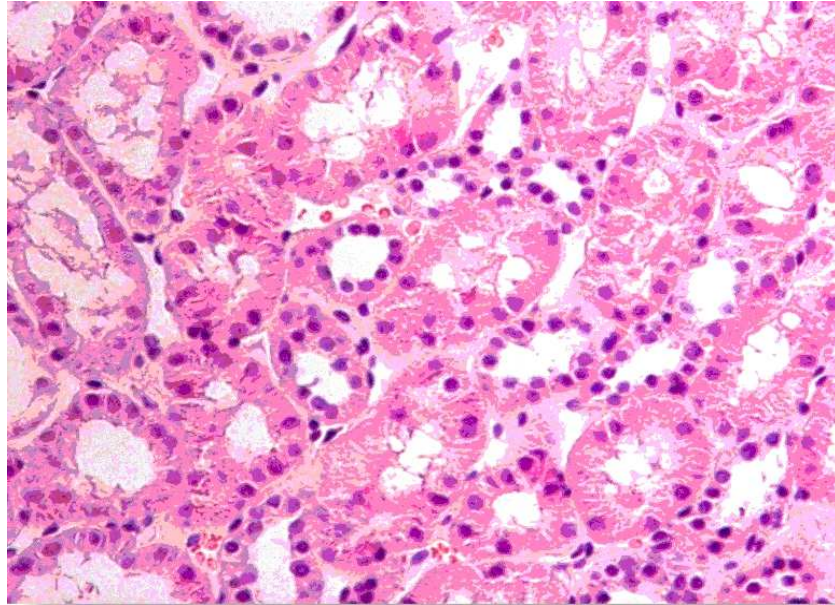
Patients with ESRD in long term follow-up were observed to have statistically significant differences in average percentage of tubulo-interstitial fibrosis, also in both method of morphometric analysis ($p < 0,001$). The extent of tubulo-interstitial fibrosis in patients with remission ($21.57 \pm 4.16\%$, $21.86 \pm 5.27\%$) was different than in remaining patients with partial remission ($26.33 \pm 3.06\%$, $27.00 \pm 2.56\%$) or progression (28.67 ± 5.03 , $29.00 \pm 4.00\%$). The extent of tubulo-interstitial fibrosis of 30% or more was related with poor long term follow-up (ESRD, progression).

The studies showed that differences between semi-automated and automated digital image analysis were not statistically significant what indicates the usefulness of automated analysis, which is easier and much less time consuming, so may be used as standard procedure helpful in morphological assesement of tubulo-interstitial fibrosis. Quantitative morphometric analysis confirmed high correlations between clinical parameters and the extent of tubulo-interstitial fibrosis.

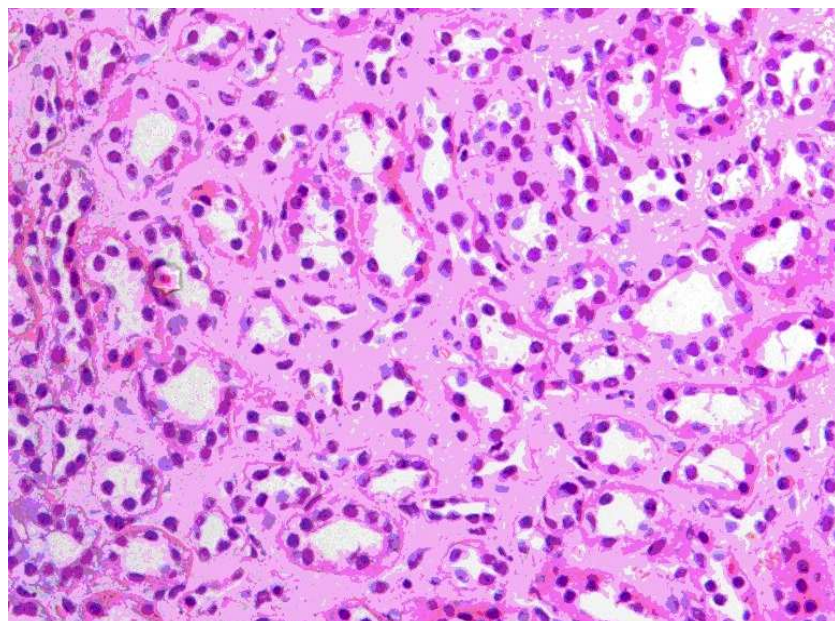
Fot. 1. Obraz ultrastrukturalny śródmiąższu nerki z widocznym pojedynczym rezydującym fibroblastem (F – jądro fibroblasta), powiększenie x 4500 (dzięki uprzejmości Prof. W. Biczysko).



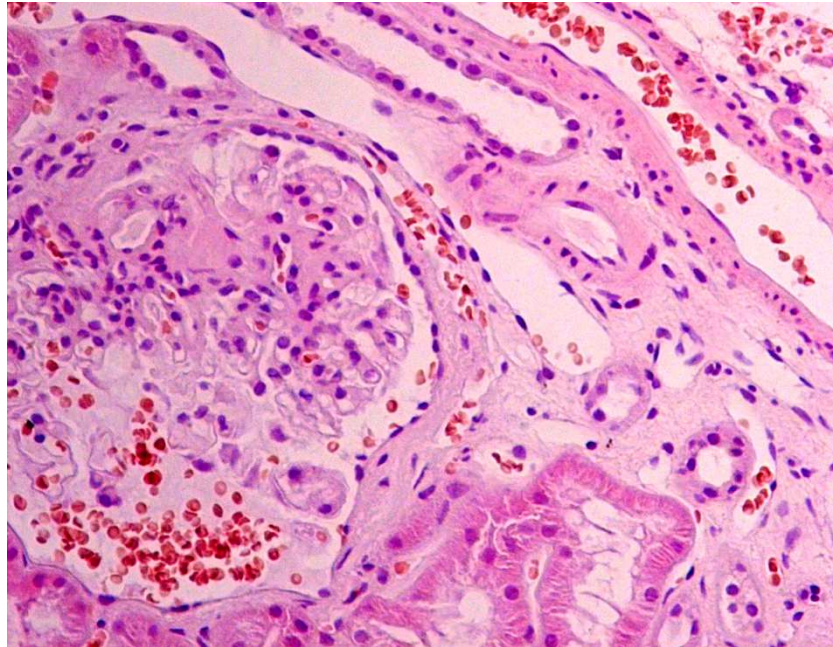
Fot. 2. Fragment punktatu nerki (grupa kontrolna) – obraz śródmiąszu prawidłowy, bez wykładników włóknienia śródmiąszowego (barwienie H&E, x 200).



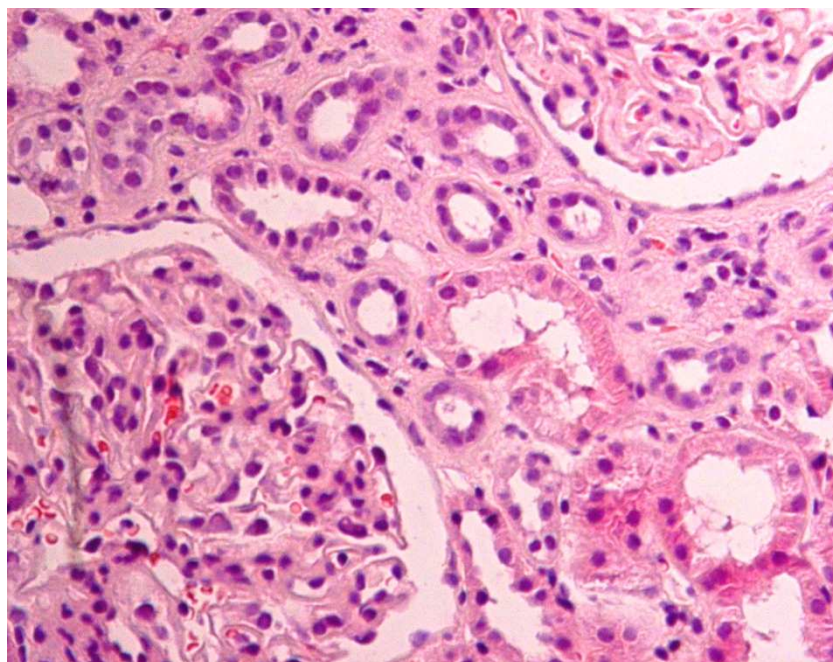
Fot. 3. Fragment biopsji nerki od chorego z FSGS – śródmiąsz z nasilonym włóknieniem śródmiąszowym (barwienie H&E, x 200).



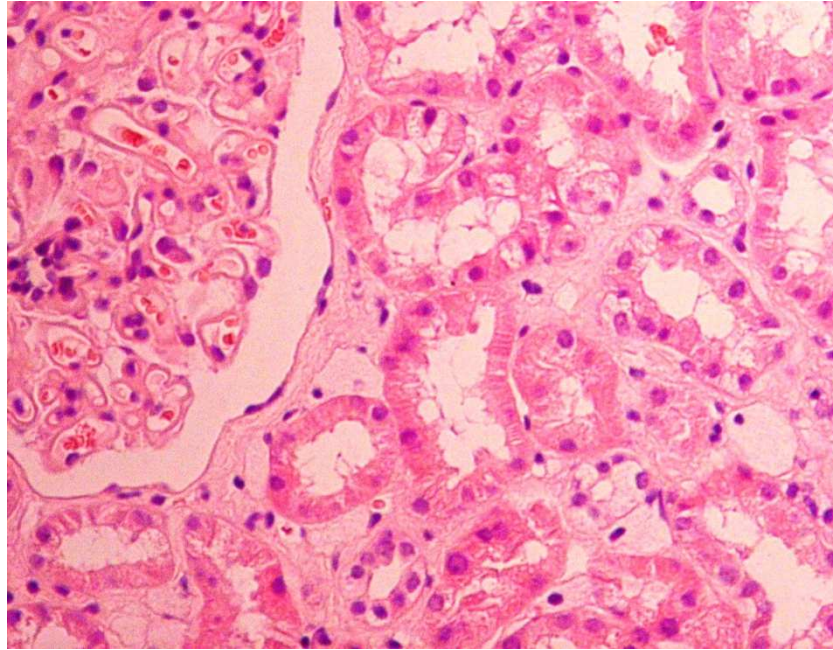
Fot. 4. Fragment biopsji nerki od chorego z FSGS – śródmiąszcz po prawej stronie z obecnością rozległego ogniska włóknienia, po lewej stronie kłębuszek z segmentalną sklerotyzacją (barwienie H&E, x 200).



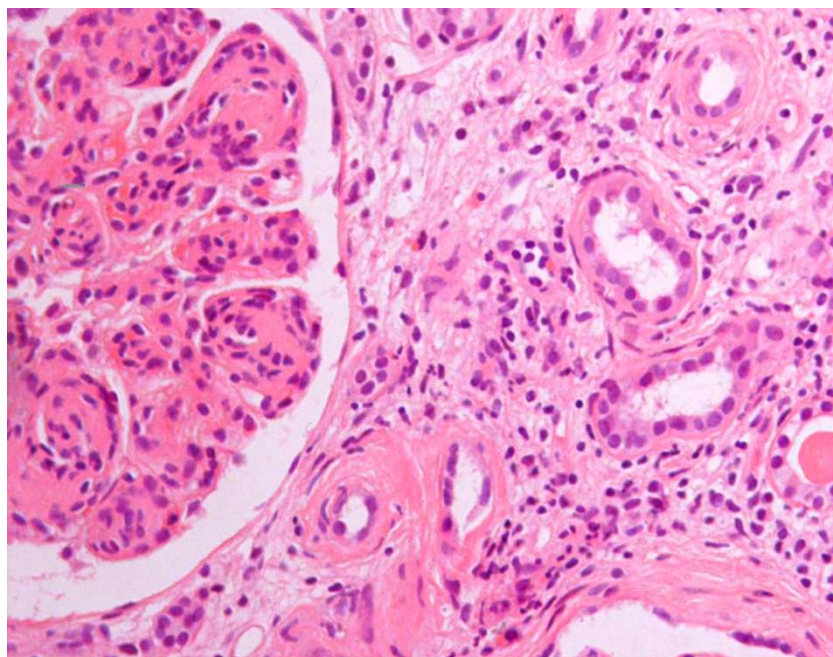
Fot. 5. Nefropatia IgA klasy IV wg Haasa. W obu kłębuszkach rozlany wzrost liczby komórek mezangialnych. Śródmiąszcz pomiędzy kłębuszkami z obecnością rozległego ogniska włóknienia (barwienie H&E, x 200).



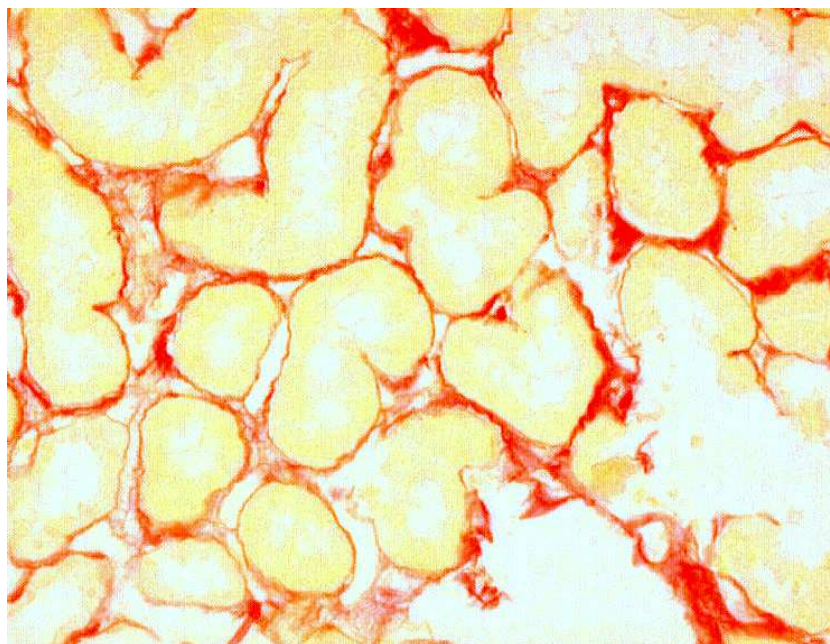
Fot. 6. Glomerulopatia błoniasta. W kłębuszku nierównomierne pogrubienie ścian pętli włosniczkowych. Śródmiąsz z obecnością włóknienia (barwienie H&E, x 200).



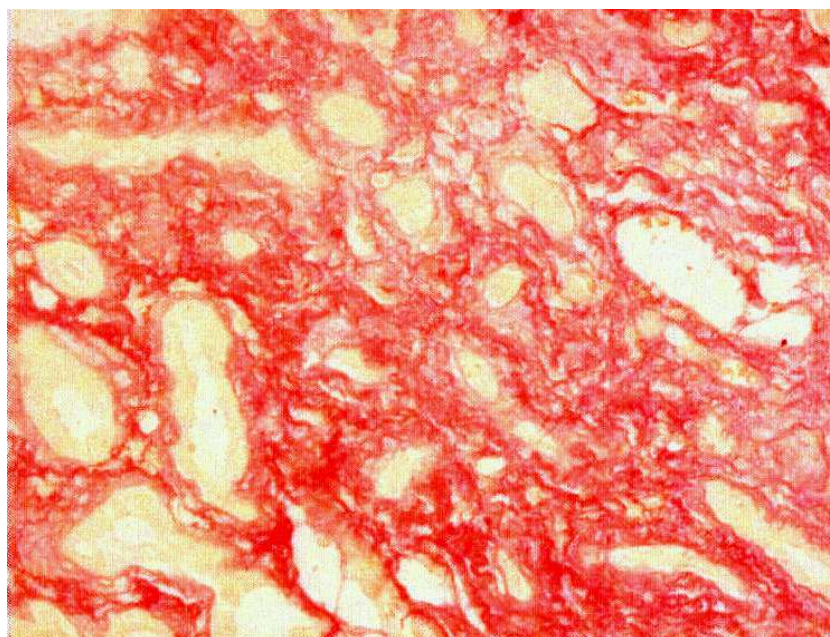
Fot. 7. Zapalenie błoniasto-rozplemowe. W kłębuszku nierównomierne, silne pogrubienie ścian pętli włosniczkowych oraz obszary mezangialne ze wzrostem liczby komórek. Śródmiąsz z obecnością nasilonego włóknienia (barwienie H&E, x 200).



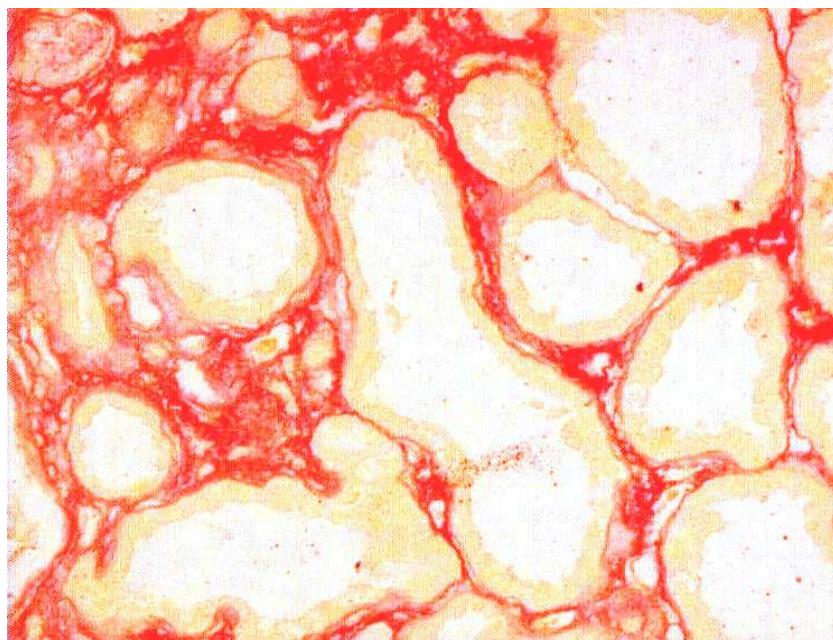
Fot. 8. Grupa kontrolna. Fragment śródmiaższu bez zmian patologicznych (barwienie czerwienią Syriusza, x 200)



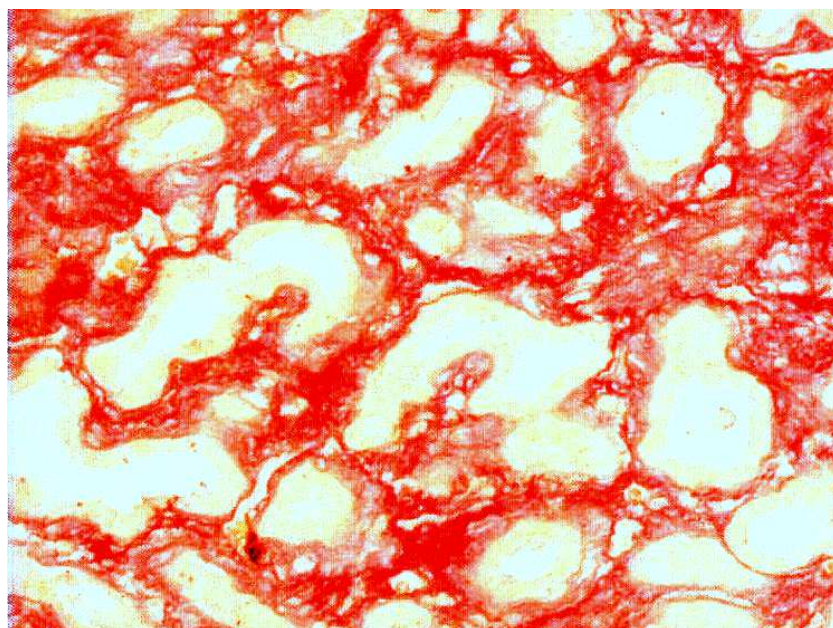
Fot. 9. Fragment śródmiaższu chorego z FSGS. Odsetek włóknienia wyniósł w tym przypadku 38-39% (barwienie czerwienią Syriusza, x 400).



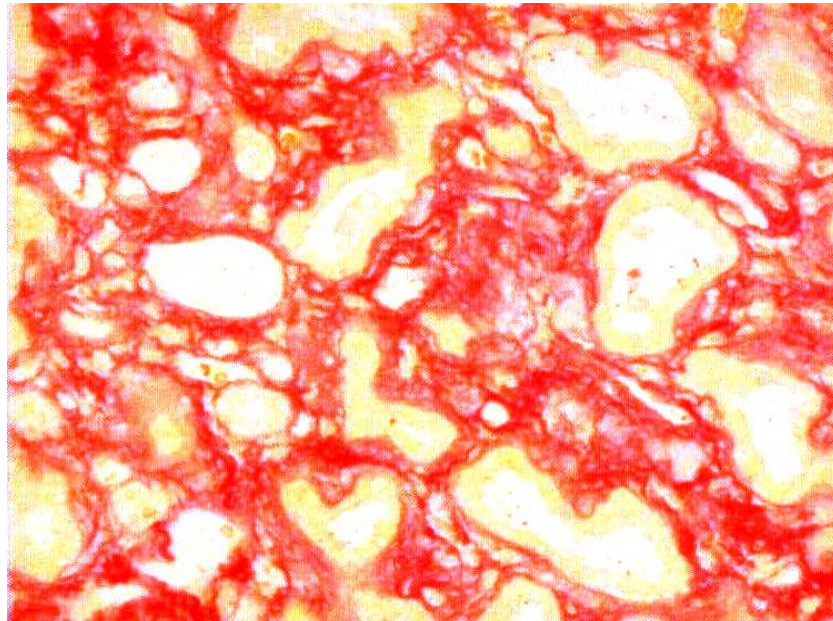
Fot. 10. Fragment śródmiaższu chorego z nefropatią IgA, odsetek włóknienia wyniósł w tym przypadku 23-24% (barwienie czerwienią Syriusza, x 400).

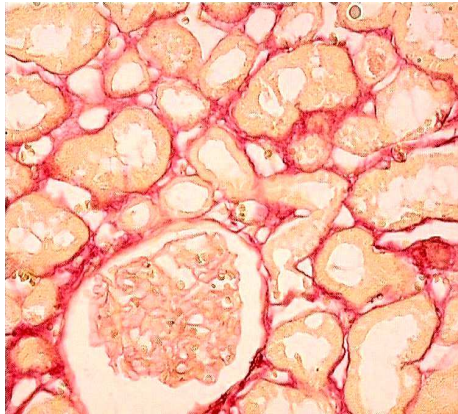


Fot. 11. Fragment śródmiaższu chorego z glomerulopatią błoniastą, odsetek włóknienia wyniósł w tym przypadku 28-29% (barwienie czerwienią Syriusza, x 400).

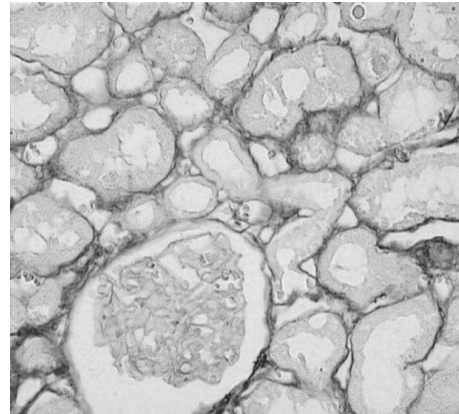


Fot. 12. Zapalenie błoniasto-rozplemowe. Odsetek włóknienia wyniósł w tym przypadku 35-36% (barwienie czerwienią Syriusza, x 400).

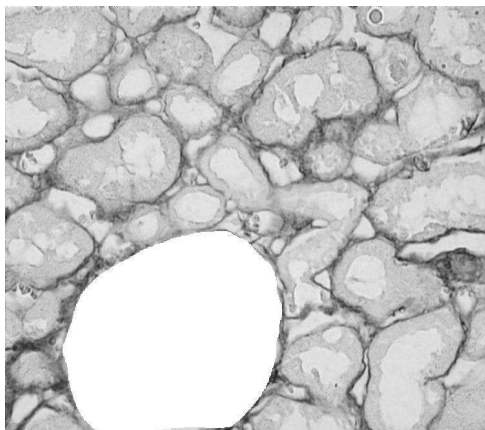




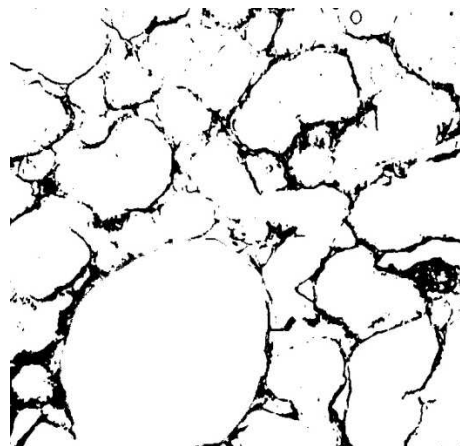
A.



B.



C.



D.

Fotografie ilustrują poszczególne etapy analizy morfometrycznej:

- A. Pierwotne zdjęcie fragmentu biopsatu barwionego czerwienią Syriusza.
- B. Obraz przetworzony za pomocą programu ImageJ – użycie filtra uśredniającego powoduje usunięcie ziarnistości i „wygładzenie” obrazu.
- C. Usunięcie fragmentu obrazu nie podlegającego dalszej analizie.
- D. Obraz binarny po segmentacji. Obszar włóknienia śródmiąższowego widoczny w kolorze czarnym.

AKWIZYCJA OBRAZU MIKROSKOPOWEGO

