

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL DAVILA”
BUCUREȘTI**

**FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
CATEDRA DE MORFOPATOLOGIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**LEZIUNILE MEMBRANELOR BAZALE GLOMERULARE ÎN
CADRUL GLOMERULONEFRITELOR CRONICE**

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

PROF. DR. FLORIN HĂLĂLĂU

PROF. DR. MARIA SAJIN

DOCTORAND

DR. DANIELA DEGERATU

București 2008

LEZIUNILE MEMBRANELOR BAZALE GLOMERULARE ÎN CADRUL GLOMERULONEFRITELOR CRONICE

I. INTRODUCERE

Glomerulonefrita definește un grup de boli renale caracterizat prin modificări inflamatorii la nivelul glomerulului renal. Glomerulonefrita poate apare ca o boală primitivă a rinichiului sau secundar în cadrul unor boli sistemice.

Diagnosticul diferențial al glomerulonefritelor primitive include următoarele entități morfologice: glomerulonefrita proliferativă difuză acută, glomerulonefrita cu leziuni minime, glomeruloscleroza focală segmentară, glomerulonefrita cu depozite de imunoglobulină A, glomerulonefrita membranoasă, glomerulonefrita membrano-proliferativă și glomerulonefrita cu semilune.

Cele mai frecvente glomerulonefrite secundare apar în boli care implică o afectare a statusului imunologic, prezența complexelor imune circulante determinând alterarea filtrului glomerular. Lupusul eritematos sistemic, amiloidoza, diabetul și vasculitele sistemice constituie condiții patologice ce determină, în majoritatea cazurilor, modificări morfologice și funcționale ale rinichiului prin afectarea structurilor vasculare renale.

În cadrul glomerulonefritelor membrana bazală glomerulară poate suferi o varietate de modificări, incluzând creșterea sau descreșterea grosimii, contururi neregulate, cutări (ondulări), scindări, reduplicări, rarefierii, precum și prezența de depozite la nivelul laminei densa sau la nivelul celor două laminae rare. Unele dintre aceste anomalii pot fi recunoscute cu ajutorul microscopiei optice, în special în colorațiile argentice și PAS, în timp ce alte leziuni pot fi identificate doar prin microscopia electronică sau imunofluorescență.

II. OBIECTIVELE STUDIULUI

Lucrarea de față are drept scop evidențierea leziunilor caracteristice fiecărui tip de glomerulonefrită, precum și realizarea unei analize morfologice, imunohistochimice (imunofluorescență) și electrono-microscopice a leziunilor membranelor bazale glomerulare cu intenția de a identifica un posibil factor comun cu impact asupra patogenezei glomerulonefritelor.

III. MATERIAL ȘI METODE

Pentru acest studiu au fost analizate prin imunofluorescență, microscopie optică și microscopie electronică 487 de puncții biopsii renale efectuate la pacienți cu vârste cuprinse între 16-65 ani.

Toate biopsiile au fost efectuate la adulți. Indicația de puncție renală a fost efectuată de către medici nefrologi conform următoarelor criterii ce variază ca formulare de la un autor la altul:

1. Sindrom nefrotic al adultului cu etiologie neprecizată sau corticorezistent.
2. Sindromul nefritic acut la adult.
3. Proteinurie > 1 g/24 h și/sau hematurie recurentă.
4. Insuficiență renală acută cu etiologie neprecizată.
5. Insuficiență renală rapid progresivă
6. Boli sistemice (LES, poliarterită nodoasă, purpură reumatoidă, vasculite, nefropatie diabetică, etc.)

Biopsiile au fost efectuate cu ace de puncție tip Ducrot-Montera de unică folosință cu sau fără arc. Fragmentele biopsice au fost împărțite astfel: treimile externe au fost fixate pentru microscopie optică și electronică iar treimea medie a fragmentului a fost congelată pentru imunofluorescență.

Pentru microscopie electronică fragmentele din biopsia renală au fost fixate în glutaraldehidă 4% și postfixate cu tetraoxid de osmiu. După deshidratare, fragmentele mici de 1 mm³, au fost incluse în rășina epoxidică (EPON). Microscopia optică a fost realizată pe secțiunile semifine de 1 μ grosime, colorate cu albastru de toluidină. Pentru microscopie electronică au fost realizate secțiuni ultrafine de 60 -80 nm contrastate cu acetat de uranyl și citrat de plumb și au fost examinate la un microscop electronic Philips 301 la 60 kw.

Studiul prin imunofluorescență directă s-a efectuat pe fragmentul de țesut proaspăt care a fost congelat rapid într-un criotom Ames II la o temperatură de -25°C. Au fost realizate secțiuni de 3-4 microni grosime, preluate pe lame de sticlă nefluorescentă. După fixarea prin uscare la temperatura camerei timp de 30-45 minute, secțiunile au fost incubate, câte două lame pentru fiecare anticorp, timp de 30 minute cu anticorpi conjugați cu FITC (izotiociant de fluoresceină). După două băi cu PBS 10% timp de 30 minute lamele au fost montate și au fost examinate, în aceeași zi, de către doi observatori. Examinarea a fost realizată cu un microscop Nikon cu epifluorescență.

Anticorpilor folosiți, conjugați cu FITC, au fost rabbit anti-human: IgA, IgG, IgM, C4, C3, albumină și fibrinogen (DAKO). Anticorpilor anti- C1q, C3c, C3d și lanțuri ușoare lambda și kappa au fost folosiți doar pentru o parte din biopsii, marcarea cu acești anticorpi începând din septembrie 2002.

În descrierea depozitelor de imunoglobuline și fracțiuni ale complementului au fost consemnate următoarele detalii: aspectul (fin granular, granular, grunjos, liniar), localizarea (capsula Bowman, mezangiu, anse capilare glomerulare, arteriole aferentă/eferentă, arteriole interstițiale, artere, epiteliul tubular, membrane bazale tubulare, interstițiul) și distribuția (focală, difuză, segmentară, globală). Intensitatea depozitelor a fost notată cu: o/negativ, +/-slab, ++/moderat și +++ /intens.

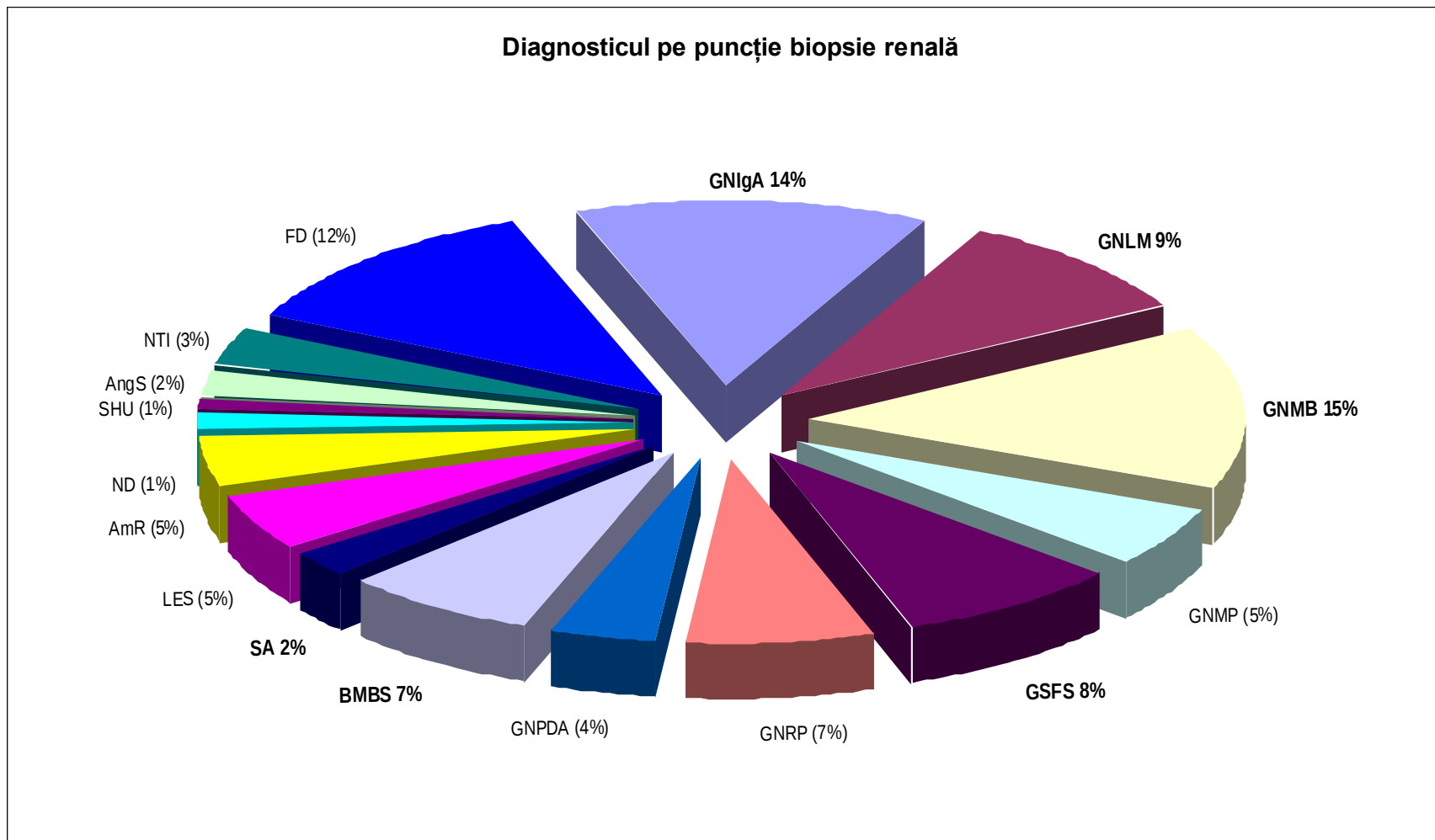
IV. REZULTATE

Toate puncțiile biopsii renale luate în studiu au fost efectuate la persoane peste 15 ani. Din cele 487 de puncții biopsii renale analizate prin imunofluorescență, microscopie optică și electronică un număr de 60 de cazuri nu au putut fi diagnosticate în 42 de cazuri fragmentele de puncție nu au conținut glomeruli iar în 18 cazuri leziunile prezente nu au putut fi incluse în nici unul din tipurile de glomerulonefrite primitive sau secundare cunoscute (neclasificabile). Din cele 427 de biopsii diagnosticate 297 au fost primitive, 46 au fost ereditare iar 84 au fost secundare. Tabelul 6 și Graficul 1 ilustrează distribuția tipurilor de GN diagnosticate.

Tabel 6. Distribuția tipurilor de glomerulonefrite diagnosticate.

	Tipul GN	Nr.
Glomerulonefrite primitive	Glomerulonefrită cu IgA	64
	Glomerulonefrită cu leziuni minime	46
	Glomerulonefrită membranoasă	69
	Glomerulonefrită membranoproliferativă	25
	Glomeruloscleroză segmentară și focală	41
	Glomerulonefrită cu semilune	33
	Glomerulonefrită proliferativă difuză acută	19
	Total	297
Nefropatii ereditare	Boala membranelor bazale subțiri	36
	Sindrom Alport	10
	Total	46
Glomerulonefrite secundare	Nefropatie lupică	25
	Amiloidoză renală	22
	Nefropatie diabetică	7
	Sindrom hemolitic uremic	4
	Nefroangioscleroză	10
	Nefropatie interstițială	16
	Neclasificabile (18)/Fără glomeruli (42)	60
	Total	144
TOTAL		487

Grafic 1. Frecvența diferitelor tipuri de glomerulonefrite pe lotul studiat.



V. DISCUȚII

Pentru acest studiu au fost analizate prin imunofluorescență, microscopie optică și microscopie electronică 487 de punctii biopsii renale.

După analiza și sinteza tuturor elementelor necesare stabilirii diagnosticului am trecut la urmărirea aspectului membranelor bazale glomerulare (MBG) pe cel puțin 3 glomeruli la fiecare caz. Astfel, am analizat grosimea lor, structura lor internă pe cele trei straturi (lamina densa, lamina rara internă și externă), electrono-densitatea, precum și repartiția defectelor constatate.

Grosimea normală a MBG-ului este dependentă de sex și de vârstă. MBG și lamina densa cresc rapid în grosime de la naștere până la 2 ani, după care urmează o îngroșare gradată în copilărie, adolescență și vârstă adultă. Grosimea MBG la adulții de sex masculin (373 ± 42) depășește pe cea a femeilor (326 ± 45). Este deci important să se țină seama de sex și de vârstă în operația de evaluare a grosimii MBG.

Îngroșarea globală și difuză a membranei bazale glomerulare este pronunțată în mod particular în cadrul glomerulosclerozei diabetice, a nefrosclerozei arteriolare, în stadiile tardive ale glomerulonefritei membranoase și în colapsul glomerular.

Grade ușoare de îngroșare, cu distribuție segmentară și focală, pot fi observate practic în orice tip de nefropatie glomerulară, în particular în stadiile cronice. Îmbătrânirea este asociată cu o îngroșare de obicei ușoară a membranei bazale glomerulare, chiar și în absența unei boli glomerulare sau vasculare [1].

Evaluarea gradului de îngroșare a membranei bazale glomerulare nu poate fi apreciată cu acuratețe cu ajutorul microscopiei optice deoarece dimensiunile normale ale membranei bazale glomerulare (300 ± 100 nm) trebuie să fie crescute de două sau trei ori pentru a putea fi apreciate prin această metodă.

Subțierea membranei bazale glomerulare este de obicei focală și este detectată doar prin microscopie electronică în situații patologice relativ rare,

cum ar fi boala membranelor bazale subțiri (hematuria familială benignă) și în unele capilare glomerulare la pacienți cu sindrom Alport, precum și la nivelul capilarelor dilatate.

Cutarea (ondularea) membranei bazale glomerulare se produce deseori în colapsul ischemic al glomerulilor, ca rezultat al nefrosclerozei arteriolare și în obstrucția arterelor renale, ca și în situația în care ghemul vascular renal este comprimat prin semilune.

Neregularitățile suprafeței externe (subepitelială) a membranei bazale glomerulare sunt tipice în cadrul glomerulonefritei membranoase, în care proiecțiile egal spațiate (spikes) de material membranar alternează cu depozite fucsinofilice sau cu complexe imune, aspect evident în impregnare argentică, cu sau fără imersie, și electronomicroscopic.

Neregularitățile suprafeței interne (subendotelială) a membranei bazale glomerulare sunt mai puțin frecvente și mai dificil de recunoscut în microscopia optică. Tardiv în cursul sindromului hemolitic uremic, spațiul subendotelial conține un material electrono-transparent, care prin metode imune, s-a dovedit a fi alcătuit din fibronectină și alte proteine [2].

Formarea unei noi membrane bazale imediat sub celulele endoteliale în aceste situații, dau aspectul de “șine de tramvai” al membranei bazale glomerulare.

Un dublu contur (reduplicarea) membranei bazale glomerulare este caracteristic în glomerulonefrita membrano-proliferativă sau mezangiocapilară, în care la nivelul anselor capilare periferice, interpoziția celulelor mezangiale între membrana bazală glomerulară și endoteliul capilar poate fi circumferențială și este asociată cu formarea unei noi membrane bazale.

În această situație, peretele capilar alcătuit în mod normal din trei straturi se transformă într-un perete cu cinci straturi, incluzând endoteliul, noua membrană bazală glomerulară, celulele mezangiale, membrana bazală glomerulară originală și celulele epiteliale viscerale. În glomerulonefrita acută proliferativă, nefrita lupică și în glomeruloscleroza diabetică se pot observa în grad redus prelungiri periferice ale celulelor mezangiale.

Scindările și rarefierile membranei bazale glomerulare sunt de obicei focale și segmentare ca distribuție și pot fi recunoscute doar la microscopul electronic. În unele biopsii, aceste aspecte apar ca urmare a resorbției complexelor imune intramembranare [3].

Laminarea membranei bazale glomerulare este pronunțată și caracteristică în sindromul Alport.

Discontinuități și gaps ale membranei bazale glomerulare sunt frecvent observate în numeroase boli glomerulare, practic în toate situațiile asociate cu hematurie și leucociturie, cum ar fi glomerulonefrita proliferativă difuză acută postinfecțioasă, nefrita lupică, glomerulonefrita crescentică, glomerulonefrita membranoproliferativă, nefropatia cu IgA, sindromul hemolitic uremic, glomerulonefrite și afectări ale coagulării intravasculare.

Gaps ale membranei bazale glomerulare sunt mai puțin frecvente în glomerulopatiile non-proliferative, cum ar fi glomerulonefrita membranoasă, boala cu leziuni minime și glomeruloscleroza diabetică, boli caracterizate prin absența sau limitarea hematuriei și a leucocituriei [4, 5, 6, 7].

Membrana bazală glomerulară este constituită predominant din collagen de tip IV, dar conține în mod normal mici cantități de alte proteine (laminină, fibronectină, entactină, albumină și IgG și proteoglicani).

Identificarea și localizarea acestor diferite componente ale membranei bazale glomerulare sunt posibile prin imunofluorescență și cu mai mare acuratețe prin microscopia electronică [8, 9].

Depozitele mici situate mezangial, subendotelial, subepitelial sau intramembranar pot fi identificate și evaluate corespunzător doar prin microscopia electronică, prin imunofluorescență și prin metode ce utilizează imunoperoxidaza.

La o mărire superioară, microscopia electronică arată că depozitele de complexe imune din nefrita lupică prezintă frecvent o substructură asemănătoare unei amprente digitale (fingerprint), care este specifică acestei boli [10, 11]. De asemenea, depozitele de crioglobuline au o structură caracterizată de mase de microtubuli [12, 13].

Atunci când depozitele subendoteliale sunt foarte mari, ca în nefrita lupică, ele se proiectează în lumenul capilar (trombi hialini).

Depozitele liniare perimembranoase sau intramembranoase, cum sunt cele alcătuite din lanțuri ușoare de proteine (kappa sau lambda), precum și depozitele depozitele cu compoziție nedeterminată din glomerulonefrita membranoproliferativă de tip II (boala cu depozite dense), pot fi recunoscute clar doar la microscopul electronic, prin imunofluorescență sau folosind imunoperoxidaza.

Principala anomalie a membranei bazale glomerulare (MBG) datorată unui defect genetic al collagenului IV determină subțierea acestora sub anumite limite și poate fi vizualizată doar în microscopie electronică. Grosimea MBG depinde de vârsta și sex fiind în general mai groasă la bărbați și oameni în vârstă. Studii elaborate, folosind metode diferite, au stabilit ca medie o grosime de 373 ± 42 nm la bărbați adulți și 326 ± 45 la femei [187].

În toate tipurile de GN am găsit prin examinare electronomicroscopică defecte ultrastructurale ale MBG. Cel mai frecvent defect al MBG observat a fost prezența unor segmente de MBG subțiri. Prezența MBG subțiri a fost segmentară și focală astfel încât am exclus existența bolii membranelor bazale subțiri care implică o leziune globală și difuză. Cu cât numărul de glomeruli examinați este mai mare cu atât șansele de a găsi segmente de MBG cu anomalii structurale este mai mare.

În GNMB datorită îngroșării marcate a pereților capilarelor glomerulare generată de prezența depozitelor în MBG nu a putut fi apreciată corect grosimea reală a MBG mai ales în stadiile finale ale bolii. Din acest motiv nu a fost luat în studiu acest tip de GN primitivă deși frecvența ei este mare (15%). În schimb am putut constata alte tipuri de defect genetic cum ar fi lamelarea sau neregularități marcate ale MBG.

Indiferent care este metoda aleasă pentru a măsura grosimea MBG se admite ca limită între grosimea normală și MBG subțire valoarea de 250 nm [188]. Sub valoarea de 200 nm MBG este subțire indiferent de sex sau vârstă.

Existența unor MBG subțiri difuz și global este asociată cu hematuria familială benignă care are o frecvență scăzută. Prezența focală a unor segmente de MBG subțiri necesită o investigație specială și extensivă.

Pentru o analiză comparativă a datelor clinice am ales din fiecare tip de glomerulonefrită un număr egal de cazuri, cu și fără modificări de grosime ale MBG.

Defectele în structura membranelor bazale glomerulare constituie un element comun în glomerulonefritele primitive.

Rezultatele obținute confirmă prezența defectelor de MBG asociată unor GN primitive [Lanteri, 1996; Yoshida, 1998; Cosio, 1994]. Acest studiu aduce în plus informații asupra frecvenței defectelor structurale ale MBG în cadrul GN primitive.

Singura structură vasculară la nivelul căreia am putut pune în evidență defecte de structură, prin microscopie electronică, este reprezentată de capilarele glomerulare. Defectul structural cel mai frecvent întâlnit la nivelul membranei bazale glomerulare a fost prezența unor segmente subțiri (sub 250 nm) sau foarte subțiri (în jur de 100 nm).

În cazurile cu subțieri segmentare marcate ale MBG am găsit uneori și rupturi ale pereților capilarelor glomerulare cu apariția inerentă a hematiilor în spațiul Bowman și, implicit, a hematuriei microscopice.

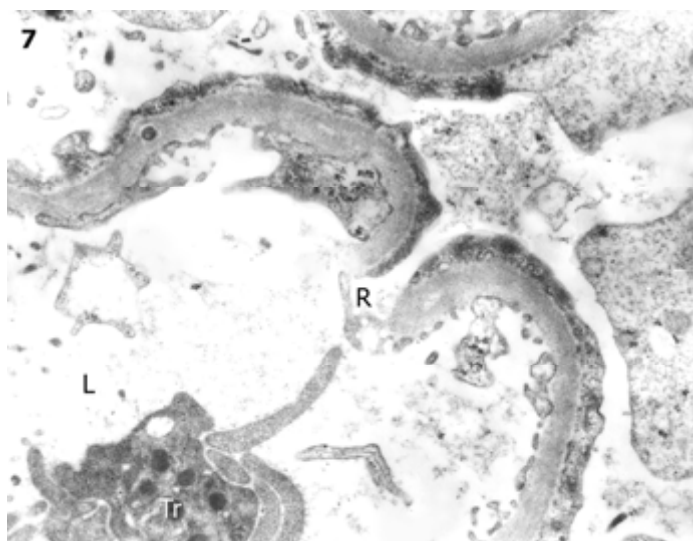


Fig. 44 – Glomerulonefrită cu leziuni minime. Ruptură (R) a peretelui capilar glomerular. Trombocit (Tr) în lumenul capilar (L). x35.000

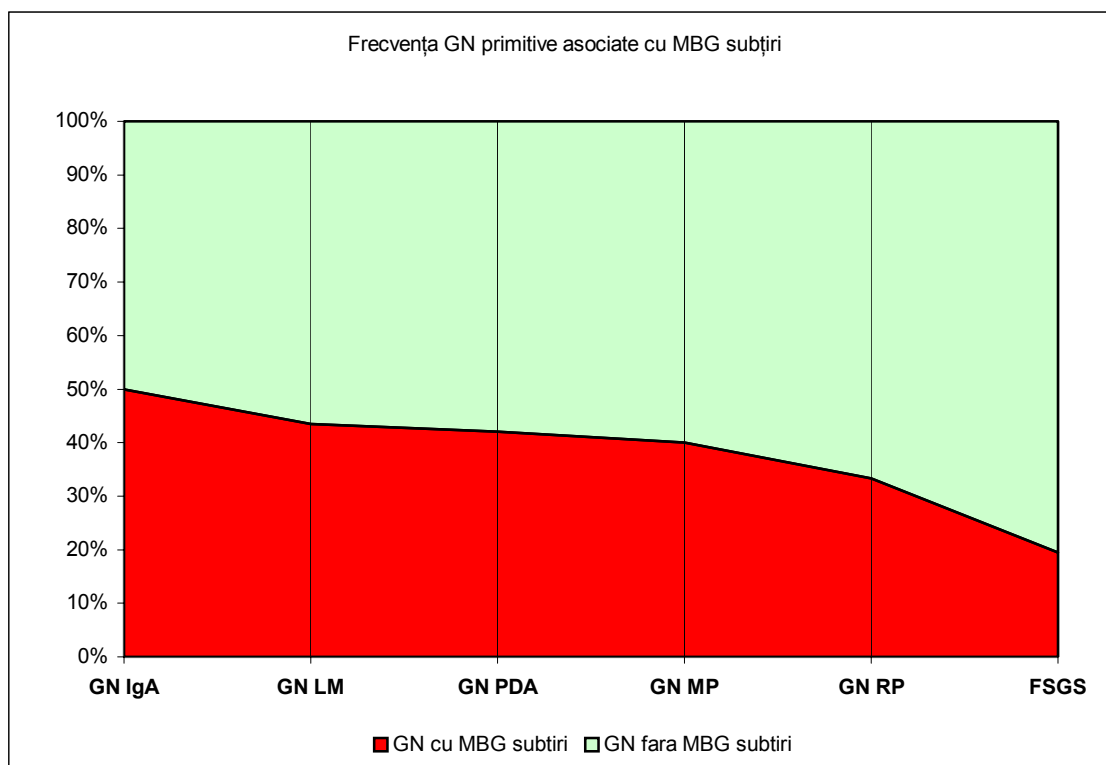
Hematuria a fost prezentă într-un procent mai mare de cazuri în acest lot decât în lotul GN fără defecte de MBG. Am constatat rupturi ale membranei bazale glomerulare în GN cu leziuni minime unde hematuria nu este un fenomen caracteristic [Gherghiceanu, 2001].

Tabelul 7 și graficul 2 ilustrează frecvența cazurilor de GN primitive care prezintă defecte ultrastructurale ale MBG.

Tabel 7. Numărul total de GN primitive și numărul cazurilor asociate cu MBG subțiri cu distribuție segmentară și focală.

GN primitivă	Total	GN cu MBG subțiri	%
IgA GN	64	32	50%
GN LM	46	20	43%
GN PDA	19	8	42%
GN MP	25	10	40%
GN RP	33	11	33.3%
FSGS	41	8	19.5%
TOTAL	228	89	39%

Grafic 2. Frecvența GN primitive asociate cu MBG subțiri



Glomerulonefritele primitive asociate cu prezenta segmentară și focală a unor MBG subțiri au următoarele caracteristici (tabel 8):

- reprezintă 39% din totalul cazurile cu glomerulonefrite primitive (50% în cazul GN IgA),
- debutează la o vârstă mai mică,
- afectează mai mult femeile,
- imunofluorescența nu a prezentat particularități.

Tabel 8. Frecvența parametrilor clinici în GN primitive cu și fără MBG subțiri:

N=89	GN fără MBG subțiri	GN cu MBG subțiri
16-30 de ani	40,44%	48,32%
30-60 de ani	43,83%	46,06%
peste 60 de ani	15,73%	5,62%
bărbați	65,16%	58,42%
Femei	34,84%	41,58%
hematurie	80,89%	82,02%
TA în limite normale	42,69%	80,89%
HTA	57,31%	19,11%

În mod surprinzător pacienții cu GN primitive asociate cu MBG subțiri au avut într-un procent semnificativ mai mic hipertensiune arterială. Această observație poate fi legată de faptul că pacienții au fost diagnosticați la o vârstă mai mică cu glomerulonefrită.

Femeile au prezentat mai frecvent decât bărbații defecte structurale ale membranelor bazale glomerulare. Această situație ar putea fi explicată prin faptul că defectele genetice ale colagenului IV care implică cromozomul X sunt exprimate incomplet fenotipic la femei [Jais, 2000].

Existența unor segmente subțiri de MBG nu reprezintă o consecință ci un factor favorizant pentru apariția glomerulonefritei primitive. Această idee este susținută de existența glomerulonefritelor primitive fără defecte de MBG și de faptul că prezența acestor defecte nu influențează patternul imunofluorescent al acestora.

Încercarea de a corela asocierea GN primitive cu MBG subțiri cu datele din imunofluorescență nu a prezentat nici un rezultat notabil. Această observație poate fi un argument în plus în favoarea ipotezei că prezența unor defecte structurale ale capilarelor glomerulare (probabil cu substrat genetic) reprezintă un factor care predispune la apariția glomerulonefritelor primitive și nu un efect.

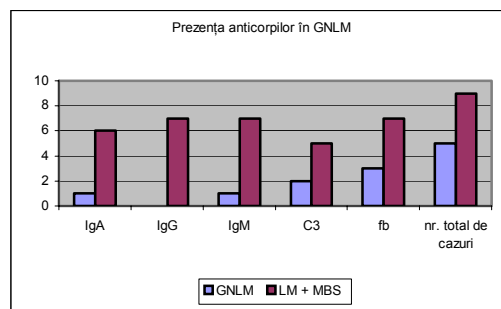
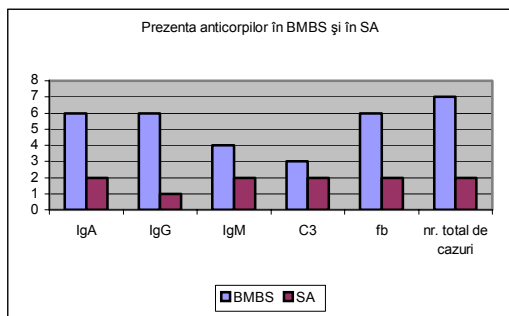
Distribuția și intensitatea depozitelor de imunoglobuline și fracțiuni de complement pentru fiecare tip de glomerulonefrită primitivă asociată cu MBG subțiri sunt redată după cum urmează:

- boala membranelor bazale subțiri și sindromul Alport – graficul 3
- glomerulonefrita cu leziuni minime (GNLM) - graficul numărul 4
- glomerulonefrita cu depozite de IgA (GNIgA) – graficul numărul 5,
- glomeruloscleroza segmentară și focală (GSFS) – graficul numărul 6,
- glomerulonefrita membranoproliferativă (GNMP) – graficul numărul 7,
- glomerulonefrita poststreptococică (GNPDA) – graficul numărul 8,
- glomerulonefrita rapid progresivă (GNRP) - graficul numărul 9.

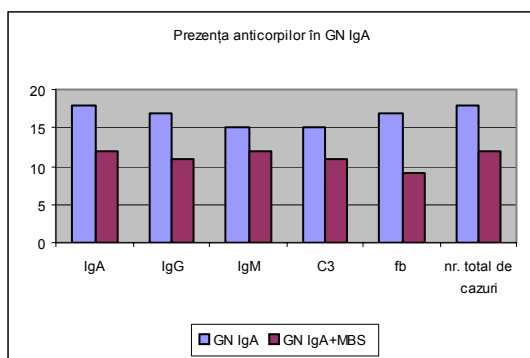
În cazul GN membranoase nu se poate efectua determinarea ultrastructurală a defectelor de MBG datorită dimensiunii depozitelor dense epimembranoase care maschează profilul real al membranelor bazale proprii.

Pentru fiecare tip de GN primitivă în care am avut asocieri cu MBS am făcut o analiză în paralel a prezenței anticorpilor anti - IgA, IgG, IgM, C3 și fibrinogen atât în cazurile fără asocieri (albastru) cât și în cele cu asocieri (rosu). În partea dreapta, pe ultima coloană a graficelor, este reprezentat numărul total de cazuri din fiecare grup studiat.

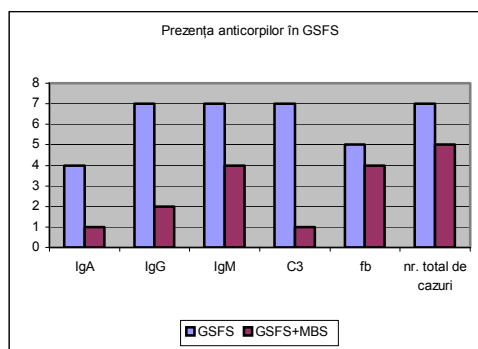
Graficul. 3 Prezența anticorpilor în BMBS și SA Graficul 4. Prezența anticorpilor în GNLM



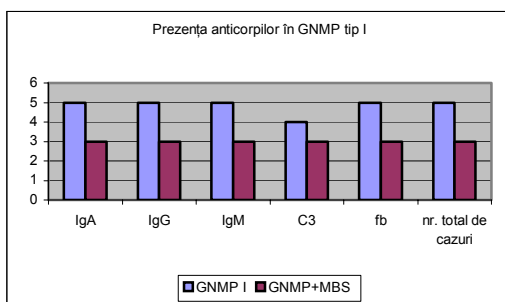
Grafic 5. Prezența anticorpilor în GN IgA



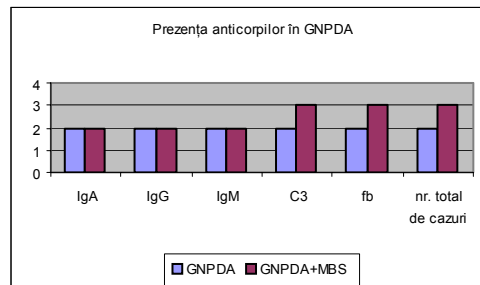
Grafic 6. Prezența anticorpilor în GSFS



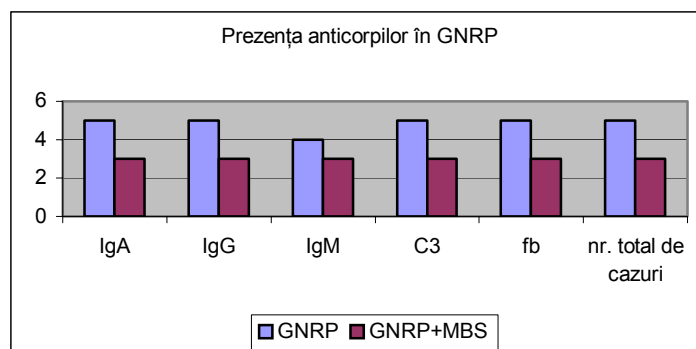
Grafic 7. Prezența anticorpilor în GNMP I



Grafic 8. Prezența anticorpilor în GNPDA



Grafic 9. Prezența anticorpilor în GNRP



După analiza distribuției anticorpilor utilizați în cazurile de glomerulonefrite ereditare (BMBS, SA) a reieșit că frecvența și pozitivitatea maximă au avut-o anticorpii conjugați anti – fibrinogen, anti- IgA și anti- IgG.

Ulterior am comparat valoarea acestor trei anticorpi conjugați în fiecare grup de glomerulonefrite asociate cu membrane bazale subțiri (MBS). Am urmărit să vedem dacă valorile lor ridicate s-au regăsit în diferitele grupe de glomerulonefrite pentru a putea efectua o corelare cu prezența sau absența defectelor genetice ale MBG.

Graficele prezentate mai sus arată că singurul anticorp conjugat cu valori mai mari sau cel puțin egale față de valoarea uzuală (considerată standard în tratatele de nefropatologie) a fost anticorpul anti – fibrinogen.

Anticorpul anti – IgA a avut valori mari în toate cazurile de GN mai puțin în GSFS.

Anticorpul anti – IgG a avut și el o prezență constant ridicată iar în cazul GNLM a fost prezent exclusiv în grupul asociat cu membrane bazale subțiri.

Anticorpul anti – IgM a fost prezent în toate GN atât în cazurile cu asocieri cu MBS cât și în cele fără MBS dar a avut un decalaj evident în favoarea GNLM asociate cu MBS.

Anticorpul anti – C3 a avut cele mai mari valori în grupul GNPDA și GNlgA. În celelalte cinci grupe de glomerulonefrite valoarea sa a fost puțin inferioară.

Valorile considerate uzuale provenite din descrierile principalilor autori de tratate de nefropatologie se referă în general la valorile maxime considerate tipice pentru fiecare glomerulonefrită în parte. Având în vedere faptul că valorile constatate au fost mediile grupelor respective din studiul propriu și nu valorile maxime de la cazurile tipice, se poate considera că și diferențele mici

sau valorile egale reprezintă informații semnificative referitoare la posibila asociere cu membrane bazale subțiri.

Prezența acestor anticorpi a fost evidențiată atât în cazurile de GN asociate cât și în cazurile de GN fără asocieri de MBS. Singura GN în care am constatat un decalaj net în favoarea cazurilor cu asocieri cu MBS a fost GNLM care reprezintă totodată și boala glomerulară cu cea mai frecventă asociere cu defecte de MBG.

Toate aceste constatări conduc la concluzia că defectele de structură ale MBG constituie un factor favorizant în apariția GN primitive determinând declanșarea glomerulonefritei la o vârstă mai mică și contribuie la progresia acesteia [Mandache și Gherghiceanu, 2004].

Datele clinice aparținând celor 89 de pacienți cu MBG subțiri sunt redată în Tabelul 9 comparativ cu un număr egal de GN primitive fără MBG subțiri.

Reprezentarea grafică a acestor date este redată în Graficul 10. Compararea acestora a arătat că doar tensiunea arterială este constant mai scăzută în grupele de glomerulonefrită cu membrane bazale glomerulare subțiri.

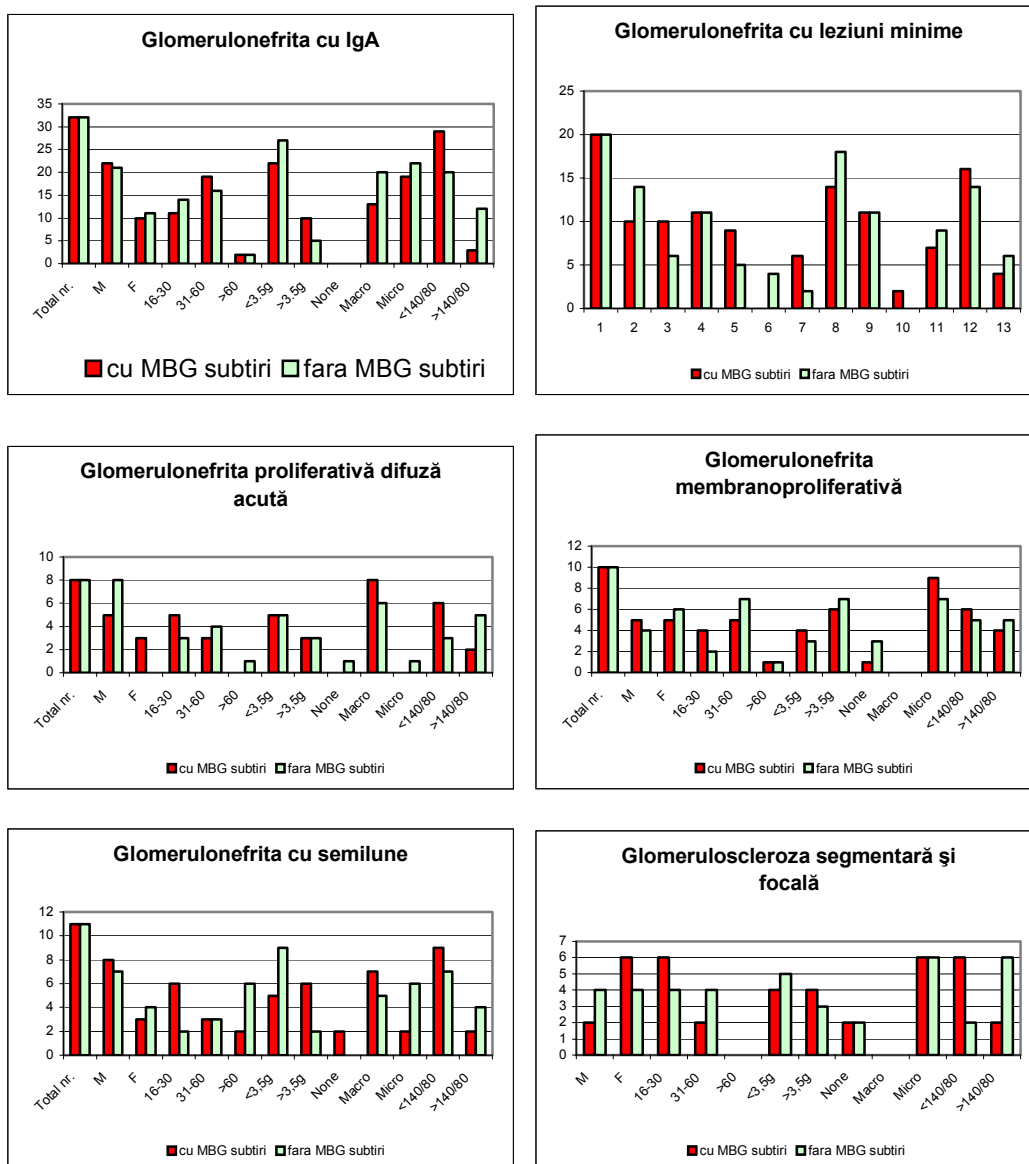
Tabel 9. Datele clinice în GN cu MBG subțiri comparate cu datele clinice în GN fără MBG subțiri.

		Sex		Vârsta			Proteinuria		Hematuria			TA/ mmHg	
GN IgA	Total nr.	M	F	16-30	31-60	>60	<3.5g	>3.5g	None	Macro	Micro	<140/80	>140/80
cu MBG subțiri	32	22	10	11	19	2	22	10	0	13	19	29	3
fără MBG subțiri	32	21	11	14	16	2	27	5	0	20	22	20	12
		Sex		Vârsta			Proteinuria		Hematuria			TA/ mmHg	
GNLM	Total nr.	M	F	16-30	31-60	>60	<3,5g	>3,5g	None	Macro	Micro	<140/80	>140/80
cu MBG subțiri	20	10	10	11	9	0	6	14	11	2	7	16	4
fără MBG subțiri	20	14	6	11	5	4	2	18	11	0	9	14	6
		Sex		Vârsta			Proteinuria		Hematuria			TA/ mmHg	
GNPDA	Total nr.	M	F	16-30	31-60	>60	<3,5g	>3,5g	None	Macro	Micro	<140/80	>140/80
cu MBG subțiri	8	5	3	5	3	0	5	3	0	8	0	6	2
fără MBG subțiri	8	8	0	3	4	1	5	3	1	6	1	3	5

		Sex		Vârsta			Proteinuria		Hematuria			TA/ mmHg	
GNMP	Total nr.	M	F	16-30	31-60	>60	<3,5g	>3,5g	None	Macro	Micro	<140/80	>140/80
cu MBG subțiri	10	5	5	4	5	1	4	6	1	0	9	6	4
fără MBG subțiri	10	4	6	2	7	1	3	7	3	0	7	5	5

		Sex		Vârsta			Proteinuria		Hematuria			TA/ mmHg	
GNRP	Total nr.	M	F	16-30	31-60	>60	<3,5g	>3,5g	None	Macro	Micro	<140/80	>140/80
cu MBG subțiri	11	8	3	6	3	2	5	6	2	7	2	9	2
fără MBG subțiri	11	7	4	2	3	6	9	2	0	5	6	7	4
		Sex		Vârsta			Proteinuria		Hematuria			TA/ mmHg	
FSGS	Total nr.	M	F	16-30	31-60	>60	<3,5g	>3,5g	None	Macro	Micro	<140/80	>140/80
cu MBG subțiri	8	2	6	6	2	0	4	4	2	0	6	6	2
Fără MBG subțiri	8	4	4	4	4	0	5	3	2	0	6	2	6

GRAFIC 10. Datele clinice. Comparație între GN primitive cu MBG subțiri și GN primitive fără MBG subțiri.



Cea mai mare frecvență de segmente subțiri de MBG apare în GN IgA (Fig. 45), urmată de GN LM (Fig. 46), GN PDA (Fig. 47), GN MP (Fig.48), și GN RP (Fig. 49). GSFS prezintă segmente de MBG subțiri într-un procent mai mic de cazuri (Fig. 50). Lamelări și neregularități evidente ale MBG fără a fi însă relevante statistic am găsit și în GNMB mergând până la aspecte de tip sindrom Alport (Fig. 51 și 52).

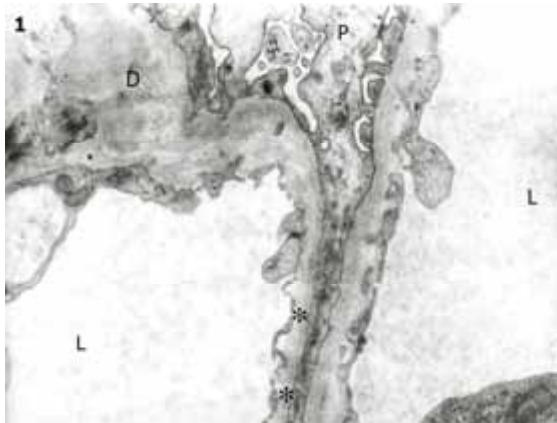


Fig. 45 – Glomerulonefrită cu IgA. Depozite dense (D) paramezangial și MBG subțire (*). Lumen capilar (L). Podocit (P). x 14.700

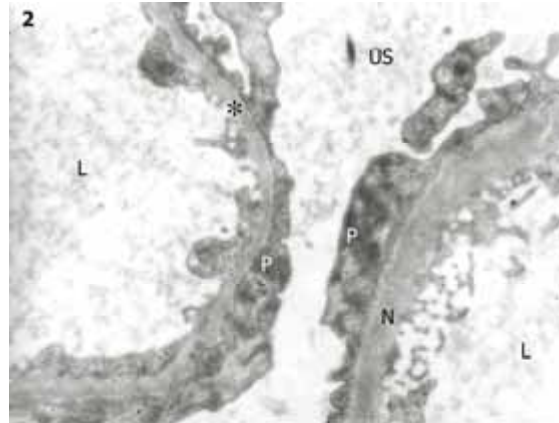


Fig. 46 – Glomerulonefrită cu leziuni minime. Una din MBG este subțire (*) în timp ce cealaltă este normală (N). Podocite (P). Spațiul urinar (US). x15.200



Fig. 47 – Glomerulonefrită poststreptococică. Depozit dens de tip "hump" (H) și MBG subțire și lamelară (*). celula mezangială (M). x10.000

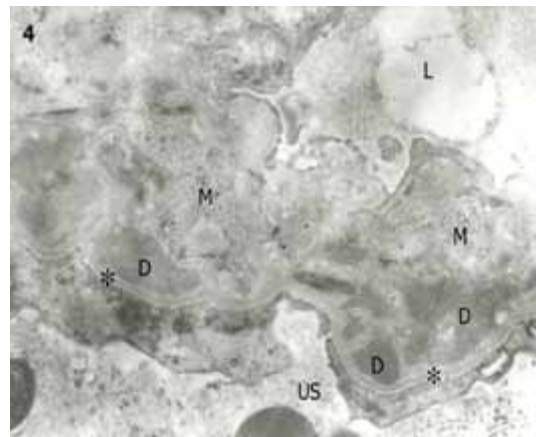


Fig. 48 – Glomerulonefrită membranoproliferativă tip I. Interpoziție mezangială (M) și depozite dense subendoteliale (D). Două segmente de MBG foarte subțiri (*). Spațiul urinar (US). Lumen capilar (L). x22.500

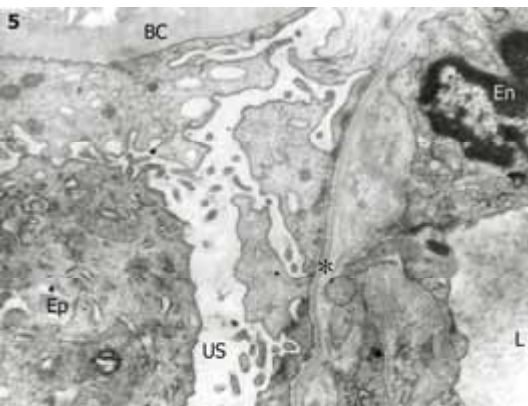


Fig. 49 – Glomerulonefrită cu semilune. Proliferare epitelială extracapilară (Ep). Perete capilar cu MBG subțire și lamelară (*). Spațiul urinar (US). Capsula Bowman (BC). Celulă endotelială (En). x14.700.

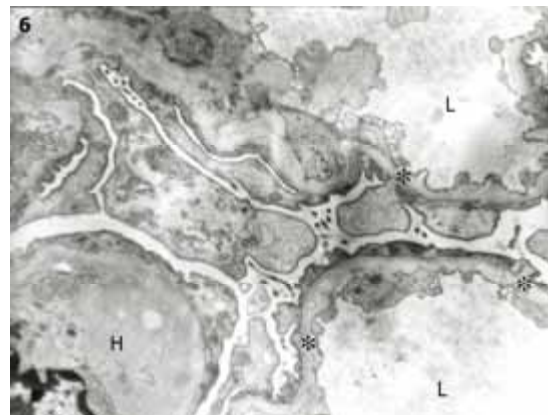


Fig. 50 – Glomeruloscleroză segmentară și focală. Un capilar cu depozit hialin (H). Pedicule șterse aproape în totalitate. Două anse capilare cu MBG subțiri și foarte subțiri (*). Lumen capilar (L). x11.500

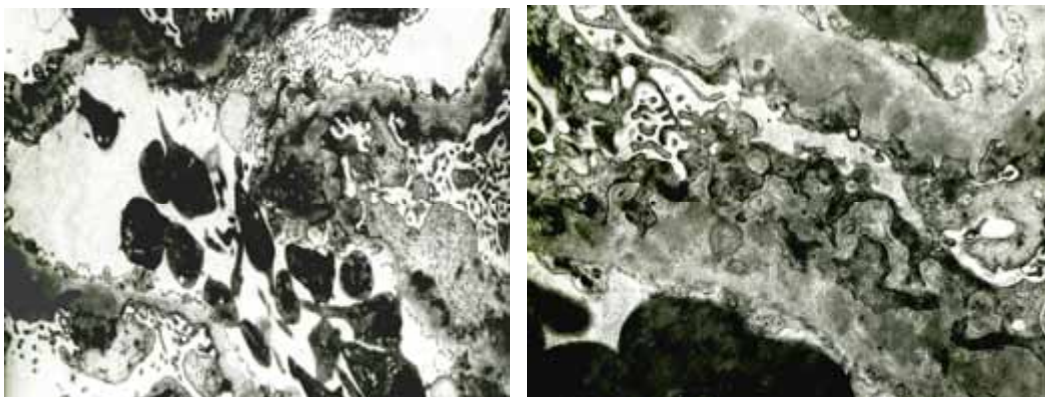


Fig. 51 – Glomerulonefrită membranoasă. Se constată pe lângă depozitele dense subepiteliale caracteristice (D), zone de MBG lamelate asemănătoare cu tipul din sindromul Alport. x 15.000

Fig. 52 – Glomerulonefrită membranoasă. Membrane bazale neregulate și cu multiple anfractuozități (MBG) în vecinătatea unor depozite dense epimembranoase caracteristice (D). x 22.000

Ca observație de ansamblu asupra studiului prezentat trebuie arătat faptul că rezultatele obținute nu pot fi comparate cu cele ale altor studii, nicidecum cu cele efectuate pe criterii clinice, datorită factorului subiectiv inevitabil introdus de faptul că nu sunt punctionați toți bolnavii cu boli glomerulare ci doar aceia care pun probleme de diagnostic. Astfel experiența profesională a celor care pun indicația de puncție biopsie își pune amprenta asupra structurii acestor grupe de bolnavi.

Aceste rezultate reprezintă doar instrumente de lucru care susțin temeinicia unui fapt de observație histopatologică, anume că există o legătură incontestabilă între patologia glomerulonefritelor și anumite defecte structurale ale MBG care de regulă au un substrat genetic.

Această constatare este de actualitate cunoscut fiind faptul că se accepta din ce în ce mai mult ca majoritatea bolilor, congenitale sau dobândite, au baze genetice. Deși în mod convențional se ia în considerație caracterul genetic numai în contextul unor boli congenitale sau moștenite, termenul genetic este actualmente perceput ca aplicabil și bolilor dobândite în aceeași măsură. Astfel bolile dobândite apar ca o consecință a expresiei unei gene anormale, cum ar fi crearea unei gene aberante (în neoplazii) sau în legătură cu prezența ei patologică (în boli infecțioase) [184].

De asemenea raportul dintre GN primitive și cele secundare nu este cel real deoarece pentru cele secundare există mai multe criterii clinice de diagnostic și mai rar ajung la puncție biopsică, cel mai adesea pentru stabilirea gradului de afectare renală.

Având în vedere faptul că lotul de bolnavi studiat a fost alcătuit din adulți, am considerat valoarea de 250 nm ca limită între MBG-urile considerate normale și cele subțiri [185, 186]. Această dimensiune este relativ ușor de determinat dacă se lucrează la aceeași treaptă de mărire și se ia în considerare un anumit element pe ecranul microscopului electronic.

O prezență de până la aproape 50 % din cazurile cu glomerulonefrite primitive a MBG subțiri sau cu alte aspecte anormale reprezintă un procent foarte ridicat. Dacă luăm în considerare și faptul că această cifră poate crește în continuare prin analize din ce în ce mai exhaustive se poate ajunge la valori impresionante. Pe de altă parte nu este obligatoriu ca toate tipurile de aberații genice COL4A3,A4,A5 să-și regăsească o expresie ultrastructurală detectabilă în microscopia electronică. Putem avea deci defecte biochimice ale colagenului IV din MBG fără modificări ultrastructurale. Ne putem astfel ușor imagina dimensiunile reale ale acestei asocieri, cu efect favorizant, defect genetic de MBG – GN primitivă.

Un studiu de perspectivă al distribuției lanțurilor alfa-3, -4, -5 (IV) în MBG la acești bolnavi ar face mai multă lumină în acest domeniu.

VI. CONCLUZII

- Scopul lucrării de față a fost realizarea unei analize morfologice, imunohistochimice și electrono-microscopice a leziunilor membranelor bazale glomerulare cu intenția de a identifica un posibil factor comun cu impact asupra patogenezei glomerulonefritelor.
- Pentru acest studiu au fost analizate prin imunofluorescență, microscopie optică și microscopie electronică un număr de 487 de punctii biopsii renale recoltate de la pacienți cu vârste cuprinse între 16-65 ani.
- Defectul structural de departe cel mai frecvent întâlnit în MBG a fost prezența unor segmente subțiri (sub 250 nm) sau foarte subțiri (în jur de 100 nm). În cazurile cu asemenea subțieri marcate ale MBG am găsit pe

alocuri și rupturi ale pereților capilarelor glomerulare cu apariția inerentă a hematiilor în spațiul Bowman și a hematuriei microscopice. Am constatat asemenea aspecte în GN cu leziuni minime unde de altfel hematuria nu este un fenomen caracteristic.

- Cu cât am insistat mai mult în anumite cazuri și am prelucrat mai mulți glomeruli, am constatat ca apariția segmentelor subțiri are un caracter segmentar și focal. Astfel, putem considera ca în privința apariției segmentelor de MBG subțiri se poate greși prin omisiune dacă analiza electronomicroscopică se rezumă la un glomerul. Cu cât se examinează mai mult material, cu atât media generală a prezenței defectelor ultrastructurale ale MBG crește.
- După analiza distribuției anticorpilor utilizați în cazurile de glomerulonefrite ereditare (BMBS, SA) a reieșit că frecvența și pozitivitatea maximă au avut-o anticorpii conjugați anti – fibrinogen, anti-IgA și anti- IgG.
- Prezența fibrinogenului asociat cu IgA și IgG ne poate determina să urmărim cu atenție sporită o eventuală asociere cu MBS în orice tip de boală glomerulară primitivă. În special un fibrinogen intens exprimat ridică o suspiciune asupra integrității MBG. Astfel, la aceste cazuri prin analiza unui număr mai mare de glomeruli crește substanțial șansa de a găsi defecte ale membranei bazale glomerulare.
- Rezultatele mai sus prezentate și analizate statistic ne-au permis să considerăm că existența unor membrane bazale subțiri sau a altor tipuri de defecte genetice ale colagenului IV constituie un factor favorizant care predispune aceasta categorie de pacienți la dezvoltarea diferitelor tipuri de glomerulonefrite primitive în anumite condiții. Același factor poate condiționa și apariția sau nu a unei nefropatii secundare în cadrul unor

boli generale cum ar fi lupusul eritematos sistemic, diabetul, vasculite, etc.

- Asocierea dintre factorul genetic și glomerulonefrite este în concordanță cu teoriile genomicii actuale cu privire la determinismul genic în patologia umană și a diagnosticului molecular nu doar în bolile recunoscute ca având factori ereditari dar și în cele dobândite unde anumite gene suferă un proces de derepresie.

VII. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney. In: BM Brenner, FC Rector (Eds): The kidney, 4th edition. WB Saunders Company. Philadelphia, USA, 1993 pp 3-75
2. Butkowski R, Wieslander J, Kleppel M, Michael AF, Fish AJ. Basement membrane collagen in the kidney: Regional localization of novel chains related to collagen type IV. *Kidney Int* 1989 35: 1195-1202
3. Weber M. Basement membrane proteins. *Kidney Int* 1992 41: 620-628
4. Turner N, Mason PJ, Brown R, Fox M, Povey S, Rees A, Pusey C. Molecular cloning of the human Goodpasture antigen demonstrates it to be the $\alpha 3$ chain of type IV collagen. *L Clin Invest* 1992 89: 592-601
5. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 1983 48: 656-677
6. Patey N, Halbwachs-Mecarelli L, Droz D, Lesavre P, Noel LH. Distribution of integrin subunits in normal human kidney. *Cell Adhes Commun* 1994 2: 159-167
7. Timpl R. Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane. *Kidney Int* 1986 30: 293-298
8. Kerjaschki D. Dysfunction of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular disease. *Kidney Int* 1994 45: 300-313
9. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is connected along the slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990 111: 1255-1263
10. Korhonen M, Ylanne J, Laitinen L, Virtanen I. Distribution of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in human fetal and adult kidney. *Lab Invest* 1990 62: 616-625
11. Ronco P, Ardaillou N, Verroust P, Lelongt B. Physiopathologie du podocyte: Cible et acteur dans les glomerulonephites. In: *Act Nephrol Hop Necker*. Flammarion Medicine-Sciences, Paris, 1993, pp 87-122
12. Chansel D, Pham P, Nivez MP, Ardaillou R. Characterization of atrial natriuretic factor receptors on human glomerular and mesangial cells. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1990 259: F619-F627
13. Appay MD, Kazatchkine MD, Levi-Strauss M, Hinglais N, Bariety J. Expression of CR 1 (CD35) mRNA in podocytes from adult and foetal human kidneys. *Kidney Int* 1990 38: 289-293
14. Floege J, Kriz W, Schulze M, Kerjaschi D, Couser WG, Koch KH. bFGF augments podocyte injury and glomerulosclerosis in rats with membranous nephropathy, but not in normal rats. *JASN* 1994 5: 778
15. Savage Cos. The biology of the glomerulus: Endothelial cells. *Kidney Int* 1994 45: 314-319
16. Abrahamson, D.R. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am. J. Physiol.* 22: F783, 1987
17. Kashgarian M, Sterzel RB. The pathobiology of the mesangium. *Kidney Int* 1992 41: 524-529
18. Abrahamson DR, Leardkamolkarn V. Development of kidney tubular basement membranes. *Kidney Int* 1991 39: 382-393
19. Lemley KV, Kriz W. Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int* 1991 39: 370-381
20. Brenner BM, Rector FC jr: The kidney, ed. 4, WB Saunders, Philadelphia, 1991
21. Droz Dominique, Lantz Brigitte. La biopsie rénale. Paris, INSERM, 1996
22. Bergijk EC, Van Alderwegen IE, Baelde HJ, de Heer E, Funabiki K, Miyai H, Killen PD, Kalluri RK, Bruijn JA. Differential expression of collagen IV isoforms in experimental glomerulosclerosis. *J Pathol* 1998 Mar;184(3):307-15
23. Tisher C.C., Brenner B.M. Renal Pathology with Clinical and Functional Correlations. 2nd edition; Lippincott, 1994.

24. Heptinstall H. Robert. Pathology of the Kidney. Fourth Edition. Little, Brown and Co. Boston/Toronto/ London. 1992
25. Ursea N., Răuță M., Degeratu D., Gherghiceanu M., Răuță A., Mandache E.: Actualități privind nefropatia lupică. *Nefrologia*, vol. 3, nr. 8, 123-144, iulie 1998
26. Burkholder M.P. Atlas Of Human Glomerular Pathology. Correlative Light, Immunofluorescence, And Ultrastructural Histology. Hagerstown, Maryland. Harper & Row Publishers, 1974; 346-359.
27. Hill, S.G. Amyloidosis In: Pathology Of The Kidney. Heptinstall H.R. Ed. a IV-a Vol. Iii, Boston, Toronto, London : Little, Brown And Company. 1992 : 1653-1675.
28. Habib R., Gubler M.C., Hinglais N., Noel L.H., Droz D., Levy M., Mahieu P., Foidart J.M., Perrin D., Bois E., Grunfeld J.P.: Alport's syndrome: Experience at Hopital Necker. *Kidney Int* 21: S20-S28, 1982
29. Georgescu L., Mănescu N., Romoșan I.: Nefropatiile glomerulare, Ed. Facla, Timișoara, 1983, 47-48
30. James Od, McGee Peter G, Isacson Nicholas A, Wright. Oxford Textbook of Pathology, Oxford Univ. Press, Oxford 1992, vol. 2a, pg. 1455-70.
31. Ursea N.: *Nefrologia*, vol.1, 9-48, 1995
32. Bridger J. Wright N.A., Amyloidosis In: Oxford Textbook Of Pathology. McGee J. O'D, Isaacson P.G, Wright N.A. (Red.) Vol.I Oxford, New York, Tokio: Oxford Univ.Press1992:406-412.
33. Husby G. Nomenclature And Classification Af Amiloid And Amyloidosis. *J. Int. Med* 1992; 232: 511-512.
34. Cunard R, Kelly CJ. Immune-mediated renal disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb;111(2 Suppl):S637-44.
35. Cosio, F., Bakaletz, A., Mahan, J. Role of precipitating and nonprecipitating antibodies in glomerular immune complex formation. *Kidney Int.* 37: 1429, 1990
36. Andres, G., Brentjens, J., Caldwell, P., Camussi, G., Kitazawa, K., Noble, B., Matsuo, S. A new look at the mechanisms responsible for in situ formation of immune deposits. Karger: New York, 1985. P. 351
37. Madaio, MP. Renal biopsy. *Kidney Int* 1990 38: 529-543
38. Mougenot, B., Jaar, B., Mignon, F. Biopsie renale. Techniques, methods percutanees, traitement des complications et indications. *Encycl Med Chir Nephrologie-Urologie*, Editions Techniques, Paris-France, 1993, 18-024-A-10, 7p
39. Lindgren, PG. Percutaneous needle biopsy: A new technique. *Act Radiol Diagn* 1982 23: 653-656
40. Mal, F., Meyrier, A., Callard, P., Kleinknecht, D., Altmann, J.J., Beaugrand, M. The diagnostic yield of transjugular renal biopsy. Experience in 200 cases. *Kidney Int* 1990 41: 445-449
41. Gaur, DD., Agarwal, DK., Khochikar, MV., Purohit, KC. Laparoscopic renal biopsy via retroperitoneal approach. *J. Urol* 1994 151: 925-926
42. Kashtan CE. Alport syndrome: an inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine.* 1999; 78(5): 338-360.
43. Heidet L, Cai Y, Guichardaud L, Antignac C, Gubler MC. Glomerular Expression Of Type IV Collagen Chains In Normal And X-Linked Alport Syndrome Kidneys. *Am J Pathol.* 2000; 156(6): 1901-1910.
44. Boye E, Mollet G, Forestier L, Cohen Solal L, Heidet L, Cochat P, Grunfeld JP, Palcoux JB, Gubler MC, Antignac C. Determination of the Genomic Structure of the COL4A4 Gene and of Novel Mutations Causing Autosomal Recessive Alport Syndrome. *Am J Hum Genet.* 1998; 63:1329-1340.
45. Ninomiya Y, Kagawa M, Iyama K, Naito I, Kishiro Y, Seyer JM, Sugimoto M, Ohashi T, Sado Y. Differential Expression Of Two Basement Membrane Collagen Genes, Col4a4 And Col4a5, Demonstrated By Immunofluorescence Staining Using Peptide Specific Monoclonal Antibodies. *J Cell Biol.* 1995; 130: 1219-1229.
46. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Krejkova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. X-linked Alport Syndrome: Natural History in 195 Families and Genotype Phenotype Correlations in Males. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:649-657.
47. Dische FE. Measurement of glomerular basement membrane thickness and its application to the diagnosis of thin-membrane nephropathy. *Arch Pathol Lab Med.* 1992; 116:43-49.