



Атякшин Д.А.¹, Морозов С.Л.^{2,3} ✉, Длин В.В.², Байко С.В.⁴

¹ Научно-образовательный ресурсный центр инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

² Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Роль тучных клеток в формировании тубулоинтерстициального фиброза в результате хронического почечного повреждения: клинический случай

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн статьи, анализ данных и написание текста – Атякшин Д.А., Морозов С.Л.; научное редактирование – Длин В.В., Байко С.В.

Подана: 28.04.2023

Принята: 29.05.2023

Контакты: mser@list.ru

Резюме

Фиброз почек – сложное полиэтиологическое прогрессирующее заболевание, представляющее собой интраорганный разрастание соединительной ткани с появлением рубцовых изменений. Однако патогенетические механизмы фиброза почек остаются не до конца выясненными. В статье разбираются особенности протеазного фенотипа и гистотопографии тучных клеток (ТК) почки как одних из ключевых игроков ремоделирования внеклеточного матрикса при нефрофиброзе у пациента с диагнозом «нефросклероз с отсутствием функции верхнего сегмента удвоенной правой почки в исходе рефлюксирующего мегауретера верхнего сегмента удвоенной правой почки». Наибольшее содержание ТК обнаруживалось в зонах с фиброзными изменениями почки. ТК принимали активное участие в развитии воспалительных и фиброзных изменений в ограниченных локусах специфического тканевого микроокружения почки посредством таргетной секреции триптазы, химазы и карбоксипептидазы АЗ к эндотелию сосудов, эпителию нефронов, клеткам интерстиция и компонентам межклеточного вещества. Формированию профиброзного фона в интерстиции почки способствовали эпигенетические эффекты триптазы, обуславливающие эпителио-мезенхимальный переход эпителия нефронов. Избирательное увеличение числа и таргетной секреторной активности ТК в ограниченных локусах паренхимы почки без видимых патологических изменений свидетельствует о триггерной патогенетической роли специфических протеаз в формировании локального микроокружения с

профиброгенным метаболическим профилем. Таким образом, ТК принимают активное участие в механизмах формирования и эволюции фиброгенных ниш в почке, что может быть использовано для разработки новых стратегий лечения тубулоинтерстициального фиброза в результате хронического повреждения почек. Дальнейшее исследование молекулярного фенотипа тучных клеток открывает новые фундаментальные механизмы патогенеза фиброза и является важным инструментом персонализированной терапии в нефрологии.

Ключевые слова: почка, фиброз, хроническая болезнь почек, нефросклероз, профиброзный фенотип, триптаза, химаза и карбоксипептидаза А3

Dmitry A. Atyakshin¹, Sergey L. Morozov^{2,3} ✉, Vladimir V. Dlin², Sergey V. Baiko⁴

¹ Scientific and Educational Resource Center for Innovative Technologies of Immunophenotyping, Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

² Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Role of Mast Cells in Formation of Tubulointerstitial Fibrosis Resulting from Chronic Kidney Injury: A Case Report

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: article concept and design, data analysis and text writing – Dmitry A. Atyakshin, Sergey L. Morozov; scientific editing – Vladimir V. Dlin, Sergey V. Baiko.

Submitted: 28.04.2023

Accepted: 29.05.2023

Contacts: mser@list.ru

Abstract

Kidney fibrosis is a complex polyethiological progressive disease consisting in intraorganic connective tissue proliferation accompanied by cicatricial changes. However, the pathogenetic mechanisms of renal fibrosis remain understudied. The article analyzes features of the protease phenotype and histotopography of mast cells (MC) of the kidney, as one of the key players in the remodeling of the extracellular matrix in nephrofibrosis, in a patient diagnosed with "nephrosclerosis with no function of the upper segment of the doubled right kidney in the outcome of refluxing megaureter of the upper segment of the doubled right kidney". The highest MC level was found in areas with fibrotic changes in the kidney. MCs were actively involved in the development of inflammatory and fibrotic changes in limited loci of the specific tissue microenvironment of the kidney through targeted secretion of tryptase, chymase, and carboxypeptidase A3 to the vascular endothelium, nephron epithelium, interstitium cells, and components of the intercellular substance. The formation of a profibrotic background in the interstitium of

the kidney was facilitated by the epigenetic effects of tryptase conditioning the epithelial-mesenchymal transition of the nephron epithelium. A selective increase in the number and targeted secretory activity of MCs in limited loci of the kidney parenchyma without visible pathological changes indicates a trigger pathogenetic role of specific proteases in the formation of a local microenvironment with profibrogenic metabolic profile. Thus, MCs are actively involved in the mechanisms of fibrogenic niches formation and evolution of in the kidney, which can be used for developing new treatment strategies for tubulointerstitial fibrosis resulting from chronic kidney damage. Further investigation of mast cells molecular phenotype provides new fundamental mechanisms of fibrosis pathogenesis and serves an important tool for personalized therapy in nephrology.

Keywords: kidney, fibrosis, chronic kidney disease, nephrosclerosis, profibrotic phenotype, tryptase, chymase and carboxypeptidase A3

■ ВВЕДЕНИЕ

Хроническая болезнь почек (ХБП) в современной литературе расценивается как прогрессирующее состояние, приводящее к развитию терминальной почечной недостаточности [1–5]. Из определения KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) ХБП представляет собой стойкое снижение функции почек, которое продолжается более 3 месяцев на фоне различных интраорганных патологических процессов.

Уникальность этого состояния состоит в том, что оно отличается выраженной гетерогенной этиологией, известным исходом и до настоящего времени неясными патогенетическими механизмами, вызывающими прогрессирование заболевания [6–8].

В структуре ХБП у детей, по данным Национального реестра по наблюдению за состоянием здоровья (NHANES), США, лидирующие позиции занимают негломерулярные поражения почек, такие как обструктивная уропатия, дисплазия почек, рефлюкс-нефропатия, двусторонний гидронефроз, поликистоз почек, инфаркт почки, цистиноз и др. (рис. 1) [9].

Замечено, что любое хроническое повреждение почек имеет в своем роде накопительный эффект, когда при достижении определенного порога патологический процесс принимает быстрое прогрессирующее течение, в результате которого наблюдается потеря функции с формированием фиброза [10].

Существует несколько теорий, или моделей, объясняющих механизмы развития и прогрессирования фиброзирующих процессов в почечной ткани. Например, гипотеза перегрузки связывает вторичную гибель нефронов с их компенсаторной гиперфункцией в ответ на первичное повреждение [11]. Как альтернатива рассматривается гипотеза фиброза, которая предполагает развитие иммунного воспаления в ответ на повреждение тубулоинтерстиция, причем морфологическая картина в виде увеличения интерстициального объема и фиброза, уменьшения перитубулярных капилляров, морфологических изменений эпителиальных клеток канальцев и интенсивности интерстициального воспаления коррелирует с ухудшением функции почек [12].

Формирование фиброза почек представляет достаточно логическую цепочку событий, происходящих в органе. Любое почечное повреждение, высокие



Рис. 1. Структура ХБП у детей, по данным NHANES [9]
Fig. 1. CKD structure in children according to NHANES data [9]

метаболические потребности вызывают канальцевые нарушения, что, в свою очередь, опосредованно влияет на патологические изменения в почечной паренхиме. Различные негативные факторы, повреждающие интерстиций почки, в комбинации с воспалительными клетками инициируют дальнейшие патологические изменения в почечной паренхиме, приводя к своеобразной тканевой реакции и создавая петлю прямой связи с повреждением почек и прогрессирующей потерей функции.

В настоящее время известно, что фиброзирующие процессы в почке приводят к образованию рубцов в паренхиме, представляя собой общий конечный путь прогрессирующей нефропатии. Поэтому активное изучение патогенеза и защитных мер при фиброзирующих процессах в почках важно для улучшения прогноза заболеваний почек. В последние десятилетия проводились серьезные фундаментальные исследования механизмов фиброза почек для разработки эффективных методов лечения. Однако следует заметить, что до сих пор многие вопросы патофизиологии фиброза почек, профилактических мер, алгоритмов диагностики и терапии остаются нераскрытыми, что требует продолжения исследования механизмов ремоделирования интерстиция [13, 14].

Развивающийся профиброзный фенотип в определенных локусах специфического тканевого микроокружения поддерживается рядом механизмов, формирующих стойкие изменения патогенетически важных констант интегративно-буферной метаболической среды. В результате образуются интраорганные тканевые ниши с особенностями функциональной архитектуры иммунного и стромального ландшафтов, избирательно накапливающие широкий перечень провоспалительных факторов, включая внеклеточные везикулы, метаболиты, цитокины, хемокины и факторы роста, в том числе в почках [13, 15].

Фиброгенное специфическое тканевое микроокружение обладает выраженной индуктивностью и продолжительной автономностью для индуцирования пролиферации фибробластов, повреждения эпителия нефронов, альтерации эндотелия микроциркуляторного русла, поляризации макрофагов и других изменений [13, 17–19].

Исследование механизмов формирования профиброгенной метаболической среды в пределах локального тканевого микроокружения существенно расширяет наши представления о патогенетических механизмах формирования фиброза почек [20].

Известно, что тучные клетки (ТК) являются ключевыми регуляторными элементами специфического тканевого микроокружения и обладают уникальными возможностями в реализации врожденного и приобретенного иммунитета, а также ремоделирования внеклеточного матрикса [21, 22].

Обладая широким репертуаром рецепторного аппарата и секреторных продуктов, ТК принимают участие как в поддержании канонических физиологических параметров местного гомеостаза, так и в инициации процессов онкогенеза, аллергии, воспаления, фиброза и многих других [23–25].

Известный факт увеличения количества интраорганных ТК в локусах с фиброзными изменениями, включая почки, до сих пор не сопровождается конкретными данными их интеграции в патогенетические звенья заболевания [26, 27].

В этой связи необходимы дальнейшие исследования механизмов участия ТК в ремоделировании внеклеточного матрикса и образовании избыточных волокнистых структур при фиброзе почек. В данной работе мы проанализировали состояние специфических протеаз ТК почки (триптазы, химазы, карбоксипептидазы А3) в патогенезе тубулоинтерстициального фиброза у пациента с диагнозом «нефросклероз с отсутствием функции верхнего сегмента удвоенной правой почки в исходе рефлексирующего мегауретера верхнего сегмента удвоенной правой почки».

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на биоматериале почки, полученном от пациента 3 лет после операции геминефруретерэктомии верхнего сегмента удвоенной правой почки, проведенной в Научно-исследовательском клиническом институте педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

Из анамнеза заболевания известно, что ребенок от 3-й беременности. Беременность протекала на фоне выраженного многоводия, однократного тугого обвития пуповины вокруг шеи плода. Роды срочные на 40-й неделе гестации. После рождения у ребенка диагностирован врожденный порок развития органов мочевой системы: неполное удвоение правой почки, гидронефротическая трансформация вентральной части удвоенной почки, шеечная эктопия, стеноз и уретероцеле устья мочеточника верхнего сегмента удвоенной правой почки. По месту жительства в связи с обструктивным гидронефрозом в возрасте 3 месяцев жизни ребенку проведено эндоскопическое рассечение уретероцеле справа, а в 19 и 32 месяца – повторные операции – эндоскопическое моделирование устья мочеточника верхнего сегмента удвоенной правой почки, что привело к формированию пузырно-мочеточникового рефлюкса 4-й степени, осложненного развитием рецидивирующего обструктивного пиелонефрита. При обследовании в Научно-исследовательском клиническом институте педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева у ребенка по данным компьютерной томографии с контрастированием выявлено неполное удвоение правой почки, гидронефроз верхнего сегмента правой почки 4-й степени с признаками атрофии паренхимы. По данным статической нефросцинтиграфии

индекс интегрального захвата верхней половины правой почки составлял 7%. В связи с отсутствием функции верхнего сегмента удвоенной правой почки, с признаками нефросклероза, наличием рецидивирующего пиелонефрита принято решение о геминефруретерэктомии верхнего сегмента удвоенной правой почки.

Настоящее исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека» и одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации. Информированное согласие было получено от законного представителя ребенка. Образцы были деидентифицированы.

Для проведения морфологических исследований фрагмент почки фиксировали в забуференном 4% формальдегиде и заливали в парафин. Парафиновые срезы ткани (толщиной 5 и 2 мкм для гистохимического и иммуногистохимического окрашивания соответственно) депарафинизировали ксилолом и регидратировали в соответствии со стандартным протоколом [28]. Для иммуногистохимического анализа депарафинированные срезы подвергали процессу демаскировки антигена при температуре 95 °C (30 мин.) в специализированном буфере R-UNIVERSAL (Aptum Biologics Ltd., Southampton, SO16 8AD, UK). Блокирование эндогенных Fc-рецепторов перед инкубацией с первичными антителами не проводилось в соответствии с практическими рекомендациями [29]. После блокады активности эндогенной пероксидазы (при необходимости) наносили первичные антитела (табл. 1) в концентрации от 1 до 5 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при температуре +4 °C. Визуализацию первичных антител в тканевых структурах проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (amplistain™ anti-mouse 1-step HRP или amplistain™ anti-rabbit 1-step HRP, SDT GmbH, Germany), и системы детекции DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). При реализации дизайна иммуногистохимического окрашивания с одновременной детекцией нескольких молекулярных мишеней использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами Alexa Fluor-488 (goat anti-rabbit IgG Ab, #ab150077) или Cy3 (goat anti-mouse IgG Ab, #ab97035), с итоговой концентрацией антител от 5 до 10 мкг/мл PBS. Ядра контрастировали с помощью гематоксилина Майера (HK-G0-DL01, «Биовитрум») с последующим заключением срезов в постоянную монтажную среду или раствором DAPI (#D9542-5MG, Sigma) при флуоресцентном мечении с использованием временной монтажной среды (Vectashield® Mounting Medium (#H-1000), Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Гистохимическое окрашивание толуидиновым синим, многокомпонентным раствором Гимзы и Пикро Маллори, азаном по Гейденгайну, гематоксилином и эозином, а также импрегнация серебром проводились согласно инструкции производителя (табл. 2).

Окрашенные срезы исследовали на моторизованном микроскопе ZEISS Axio Imager.Z2, для фотодокументирования используя в том числе объективы Zeiss alpha Plan-Apochrom 100x/1,46 Oil DIC M27, Zeiss Plan-Apochrom 150x/1,35 Glyc DIC Corr M27 и цветную камеру ZEISS AxioCam 712. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Zen 3.0 Light Microscopy Software Package, ZEN

Таблица 1
Список первичных антител, использованных в исследовании (производитель AbCam, UK)
Table 1
List of primary antibodies used in the study (manufacturer AbCam, United Kingdom)

Антитела	Каталожный номер	Разведение
Триптаза	#ab2378	1:3000
Триптаза	#151757	1:1000
Carboxypeptidase A3	#ab251696	1:2000
Chymase	#ab2377	1:2000
α -SMA	#ab7817	1:2000
Vimentin	#ab92547	1:1000

Таблица 2
Реагенты для гистохимического окрашивания (производитель «БиоВитрум», РФ)
Table 2
Reagents for histochemical staining (manufacturer BioVitrum, RF)

Краситель	Каталожный номер
Толуидиновый синий для ТК	07-002
Многокомпонентный краситель Гимза	20-043/L
Импregnация серебром	21-026
Гематоксилин Майера	HK-G0-DL01
Пикро Маллори	21-036
Азан по Гейденгайну	21-041
Раствор эозина 1% водный	HK-EV-A250

Module Bundle Intellesis & Analysis for Light Microscopy, ZEN Module Z Stack Hardware (Carl Zeiss Vision, Германия). Некоторые микрофотографии были получены с помощью конфокального микроскопа Nikon D-Eclipse C1 Si на базе Nikon Eclipse 90i.

Количественный анализ почки проводился на 4 фрагментах для увеличения объема анализируемых структурных компонентов и повышения объективности получаемой информации. Планиметрический анализ для выявления количества ТК на единице площади ткани почки, а также абсолютного числа ТК и других клеток почки выполнялся с помощью программного продукта QuPath [30]. Аналогичным образом на гистологических срезах проводился морфометрический анализ площади иммунопозитивных структур на α -SMA и виментин, а также определение абсолютного количества триптазапозитивных ядер по отношению к общему количеству ядер с последующим расчетом относительного содержания (табл. 1). В почке отдельно анализировали корковое и мозговое вещества, а также участки органа с выраженными проявлениями фиброзных изменений. При определении SMA- и виментинпозитивных клеток и структур для объективизации получаемой информации из анализируемых областей исключались сосуды почки. Для получения интегральных значений исследуемых параметров ТК и фиброза получали среднее значение из результатов анализа каждого фрагмента почки.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Наибольшее содержание ТК как в расчете на миллиметры квадратные, так и относительно общего числа клеток в ткани отмечалось в фиброзно-измененных областях почки (табл. 3, рис. 2). Во всех зонах почки наибольшей численностью обладали

триптазапозитивные ТК (табл. 3, рис. 3). Меньшей численностью характеризовались СРАЗ-позитивные ТК (табл. 3, рис. 4), однако в мозговом веществе почки их относительное количество было сопоставимо с триптазой + ТК. Наименьшим представительством характеризовались химаза + ТК (табл. 3, рис. 5), они практически отсутствовали в корковом и мозговом веществе почки. Однако следует отметить, что в фиброзных очагах почки содержание химазапозитивных ТК было существенно выше, особенно при определении относительного содержания среди всех клеток фиброзно-измененной ткани (табл. 3, рис. 5, А).

Методика: рис. 2, А, D, Е – иммуногистохимическое окрашивание триптазы ТК (А), α-SMA (D) и виментина (Е), В – импрегнация серебром, С – окрашивание азаном по Гейденгайну.

Рис. 2, А: избирательная локализация триптазапозитивных ТК в почке, обладающих высокой активностью секреции протеазы (указано стрелкой).

Рис. 2, А': увеличенный фрагмент рис. 2, А.

Рис. 2, В, С: триптазапозитивные индуктивные поля совпадают по локализации с зонами высокого содержания ретикулярных волокон и фибриллогенеза коллагена (В – указано стрелкой), а также коллагеновых волокон и аморфного компонента внеклеточного матрикса соединительной ткани (С – указано стрелкой).

Рис. 2, D, E: солокализация интраорганной экспрессии α-SMA (D) и виментина (E) с гистотопографией ТК (указано стрелкой).

Шкала: А' – 50 мкм, остальные – 500 мкм.

Методика: иммуногистохимическое окрашивание триптазы ТК.

Рис. 3, А: участие ТК в создании профиброгенной ниши с формированием в неизменной паренхиме почки (А' – указано стрелкой) триптазаиндуктивной зоны (А'' – указано стрелкой).

Рис. 3, В: близкое расположение ТК с почечным тельцем в корковом веществе.

Рис. 3, С: таргетная секреция триптазы ТК к базальной мембране эпителия проксимального извитого канальца нефрона (указано стрелкой) и клеткам интерстиция (указано двойной стрелкой).

Таблица 3
Содержание ТК в почке при фиброзе
Table 3
MC level in the kidney with fibrosis

Зона почки	Показатели	Триптаза +	СРАЗ +	Химаза +
Корковое вещество почки	Общее количество клеток в области среза	467 240	408 847	467 609
	Абсолютное количество ТК в области анализа	757	347	49
	Относительное количество ТК в области анализа (%)	0,16	0,09	0,01
	Содержание ТК/мм ²	9,71	5,58	0,39
Мозговое вещество почки	Общее количество клеток в области анализа	193 548	195 731	199 893
	Абсолютное количество ТК в области анализа	214	196	20
	Относительное количество ТК в области анализа (%)	0,11	0,1	0,01
	Содержание ТК/мм ²	7,36	5,98	0,81
Зона фиброза	Общее количество клеток в области анализа	274 095	251 490	188 943
	Абсолютное количество ТК в области анализа	1617	1080	454
	Относительное количество ТК в области анализа (%)	0,59	0,43	0,24
	Содержание ТК/мм ²	46,31	27,52	15,26

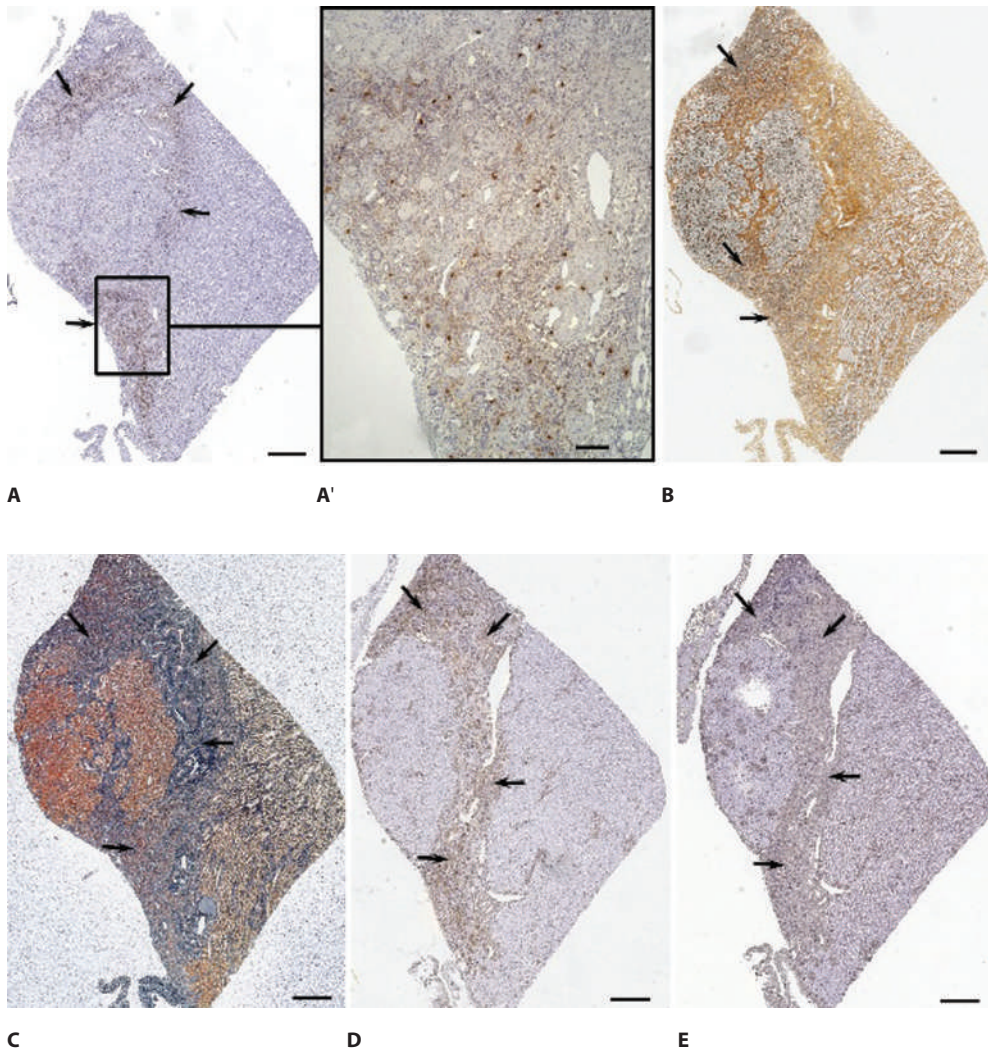


Рис. 2. Особенности ассоциации тучных клеток с элементами стромы почки при нефрофиброзе
Fig. 2. Features of the association of mast cells with elements of the kidney stroma in nephrofibrosis

Рис. 3, D, E: варианты образования профиброгенных ниш ТК в интерстиции почки с локальным накоплением триптазы во внеклеточном матриксе (указано стрелкой).

Рис. 3, F: таргетная секреция триптазы к клетке стромы с проникновением в ядерные структуры (указано стрелкой).

Рис. 3, F' – фрагмент F.

Рис. 3, G: триптазапозитивные ядра в клетках специфического тканевого микроокружения профиброгенных ниш почки. Обращает на себя внимание позитивность ядер к триптазе преимущественно в клетках интерстиция (указаны стрелкой).

Шкала: A – 500 мкм, A' – 50 мкм, остальные – 10 мкм.

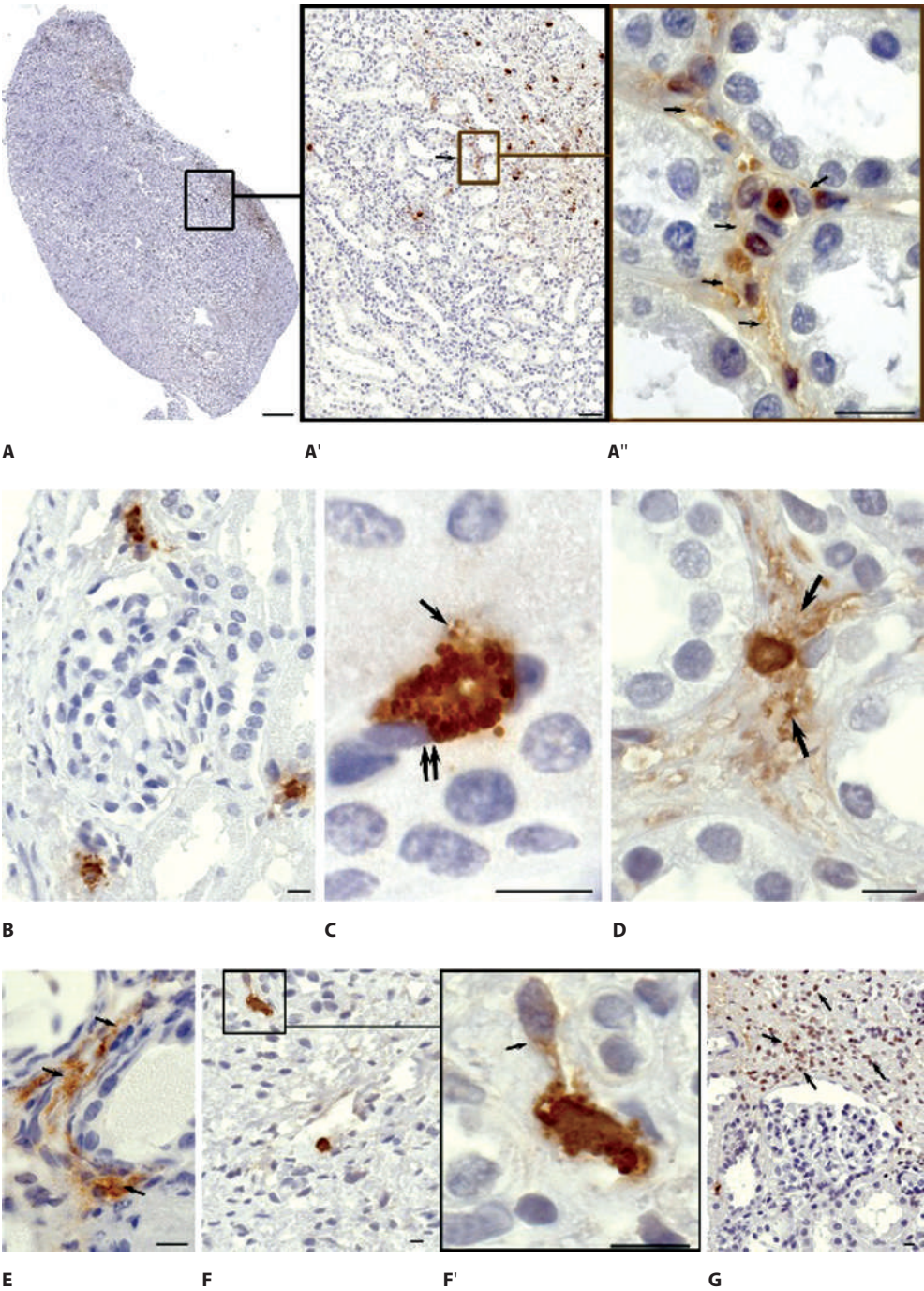


Рис. 3. Гисто- и цитотопография триптазы тучных клеток при формировании фиброзных изменений почки

Fig. 3. Histo- and cytophotography of mast cell tryptase during the formation of fibrous changes in the kidney

Несмотря на то, что относительное количество ТК в зоне фиброза характеризовалось небольшой численностью по отношению к массиву других клеток (табл. 3), обращает на себя внимание высокая секреторная активность ТК. В связи с этим в почке выявлялись области (зоны), которые были обильно инфильтрированы секреторными гранулами или обладали иммунопозитивностью к триптазе (рис. 2–4). Высокое содержание секреторных гранул, способных к автономной деятельности и постепенному высвобождению биологически активных веществ, включая триптазу, химазу и СРАЗ, могло существенно усиливать биологическую роль ТК в отдельных локусах специфического тканевого микроокружения. Формирование ТК протеазопозитивных полей, обладающих особыми индуктивными свойствами в силу накопления специфических протеаз, были описаны нами ранее и при других патологиях [27, 31].

С точки зрения цитотопографии в некоторых ТК специфические протеазы были упакованы в секреторные гранулы различных размеров, в которых они занимали периферическое положение (рис. 3, 4). Такая интрагранулярная локализация специфических протеаз была характерна и для ТК других органов [27, 31, 32]. В то же время достаточно часто триптаза, химаза и карбоксипептидаза АЗ выявлялись в виде програнул, мелких иммунопозитивных образований, распределенных по цитоплазме. Это свидетельствовало об активных процессах биогенеза, при котором синтез и посттрансляционные перестройки сопровождаются быстрой секрецией (рис. 4, 5). Кроме того, необходимо обратить внимание на регуляторные возможности ТК, реализуемые с помощью туннельных нанотрубочек [32, 33], хорошо заметных в некоторых локусах специфического тканевого микроокружения почки (рис. 4, К). Иногда можно было обратить внимание на формирование удлинённых выростов цитоплазмы, содержащих специфические протеазы, направленные к клеткам-мишеням. В зонах почек с фиброзными изменениями часто обнаруживались постклеточные структуры – автономные фрагменты цитоплазмы или свободно расположенные гранулы, способные к самостоятельной секреции биологически активных веществ определенное время после отделения от материнской цитоплазмы.

Методика: рис. 4, А–Н: иммуногистохимическое окрашивание карбоксипептидазы АЗ (СРАЗ) ТК. Рис. 4, J–L: мультиплексная иммуногистохимическая детекция триптазы и СРАЗ.

Рис. 4, А: высокое содержание ТК в зоне почки с фиброзными изменениями.

Рис. 4, В: ТК образуют группы в паракринной зоне около фибробласта (указано стрелкой).

Рис. 4, С: солокализация ТК с несколькими клетками стромы в области фиброза, активная секреция СРАЗ.

Рис. 4, D: секреция СРАЗ к эпителию нефрона (указано стрелкой) в фиброзно-измененных участках мозгового вещества почки.

Рис. 4, Е–Н: морфологические эквиваленты участия ТК в формировании профиброгенных ниш с секрецией СРАЗ (указано стрелкой) к мишеням специфического тканевого микроокружения, включая эпителий проксимальных и дистальных извитых канальцев (рис. 4, Е, F), клетки интерстиция (рис. 4, G) и листки капсулы Боумена – Шумлянського (рис. 4, H).

Рис. 4, J: поступление триптазы и СРАЗ в профиброгенную нишу в составе секреторных гранул (указано стрелкой).

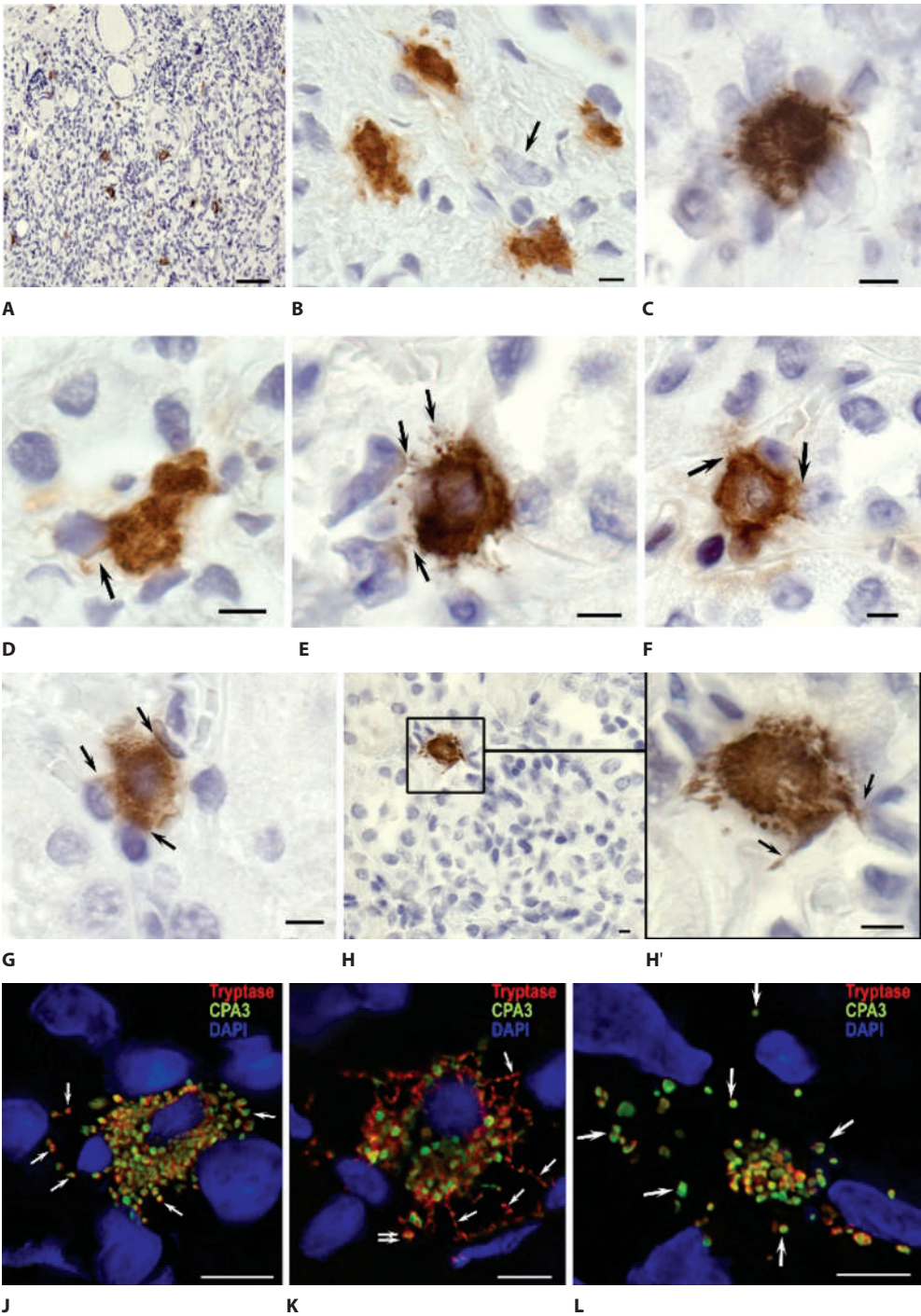


Рис. 4. Карбоксипептидаза A3-позитивные тучные клетки в почке при нефрофиброзе
Fig. 4. Carboxypeptidase A3-positive mast cells in the kidney in nephrofibrosis

Рис. 4, К: активный транспорт триптазы и СРАЗ к мишеням внеклеточного матрикса специфического тканевого микроокружения тканевой ниши в составе туннельных нанотрубочек (указано стрелкой) и секреторных гранул (указано двойной стрелкой).
Рис. 4, L: диссеминация секреторных гранул со специфическими протеазами ТК в интерстиции (указаны стрелкой), прилежащих к клеткам стромы.

Шкала: А – 50 мкм, остальные – 5 мкм.

Определение гистотопографических особенностей распределения ТК в интерстиции почки позволило выявить, что в корковом веществе, независимо от экспрессии специфических протеаз, ТК чаще всего располагались в области проксимальных или дистальных извитых канальцев, контактируя с базальной мембраной эпителия нефрона (рис. 3, А, рис. 3, В–Е, рис. 4, D–H, рис. 5, В, С). ТК могли располагаться около почечного тельца, иногда контактируя с париетальным листком капсулы Боумена – Шумлянського (рис. 3, В, рис. 4, H). В мозговом веществе наиболее частая локализация ТК была в интерстиции около отделов петли Генле (табл. 4).

ТК проявляли активную секреторную деятельность специфических протеаз в строму почки. Выявлено взаимодействие ТК с париетальным листком капсулы Боумена – Шумлянського (рис. 4, H), проксимальными извитыми канальцами (рис. 3, С, рис. 5, В), дистальными извитыми канальцами и петлей Генле (рис. 3, D, Е, рис. 4, Е, F, рис. 5, С). В зоне склерозирования отмечена солокализация ТК с другими иммунокомпетентными клетками и, очевидно, с клетками стромы (рис. 3, F, F', рис. 4, А–С, рис. 5, А, D–F). Влияние ТК на другие клетки локального тканевого микроокружения реализуется не только классическими путями дегрануляции медиаторов, но и формированием туннельных нанотрубочек, которые служат эффективным способом таргетной доставки специфических протеаз к клеточным мишеням (рис. 4, К).

Миграция ТК в межканальцевый матрикс и в некоторых случаях секреция протеаз непосредственно к базальной мембране эпителия различных отделов нефрона вызывали очевидную потерю контактов эпителия с базальной мембраной. Данные свидетельства можно связать с явлениями эпителиомезенхимального перехода, при котором существенно изменяется функциональный потенциал клетки с развитием выраженной способности к синтезу компонентов внеклеточного матрикса. При этом происходило образование триптазапозитивных участков в некоторых локусах тканевого микроокружения, характеризующихся выраженной иммунопозитивностью к протеазе и индуктивностью провоспалительных эффектов (рис. 2, А, рис. 3, А, D, Е).

Таблица 4
Гистотопография ТК в интерстиции коркового и мозгового вещества почки при фиброзе
(% от общего количества ТК)
Table 4
Histotopography of MC in the interstitium of the cortex and medulla of the kidney in fibrosis
(% of the total amount of MC)

Протеазный фенотип ТК	Локализация в корковом веществе почки			Локализация в мозговом веществе почки	
	Микроокружение капсулы почечных телец	Микроокружение проксимальных извитых канальцев	Микроокружение дистальных извитых канальцев	Собирающая трубочка	Петля Генле
Триптаза +	22,80	54,90	22,30	34,60	65,40
СРАЗ +	11,70	72,20	16,10	11,90	88,10
Химаза +	6,10	43,40	50,50	33,30	66,70

При определении экспрессии α -SMA и виментина в различных областях почки было обнаружено, что наиболее высокие значения иммунопозитивности клеток и структур выявлялись в зоне фиброза (табл. 5, рис. 2, D, E). При этом уровни содержания гладкомышечного актина и виментина коррелировали друг с другом, что подтверждало возрастание представительства структур мезенхимального происхождения вследствие возможной интенсификации эпителиомезенхимальной трансформации паренхимы почки. Гораздо меньшие показатели содержания α -SMA- и виментинпозитивных структур были получены в корковом и мозговом веществах почки (табл. 5, рис. 2, D, E).

Создавалось впечатление, что ТК инициировали первичные изменения стромы почки в месте дальнейшего развития воспалительного процесса и последующего фиброза, фактически создавая условия формирования профиброгенной ниши (рис. 3, A). На границе соприкосновения неизменной паренхимы почки с фиброзно-измененной тканью выявлялась ограниченная зона, в которой определялось большее количество триптазапозитивных ядер (рис. 3, G). В локусах профиброгенных ниш выявлялись триптазапозитивные ядра на фоне практически полного отсутствия экспрессии триптазы в ядрах клеток как паренхимы, так и интерстиция коркового и мозгового вещества почки вокруг (рис. 3, A, F, G). Эпигенетические эффекты триптазы принимали участие в создании профиброзного фенотипа специфического тканевого микроокружения с помощью репрограммирования и изменения функциональной активности других клеток, что приводило к дальнейшему прогрессированию фиброзных изменений (рис. 3, F, F'). Частота встречаемости триптазасодержащих ядер в клетках почки была наибольшей в зонах с фиброзными изменениями или пограничных областях нормальной паренхимы с патологически измененными участками. Результаты планиметрического анализа свидетельствуют о существенном превышении количества клеточных ядер с иммунопозитивностью к триптазе в фиброзных очагах почки по сравнению с аналогичными показателями коркового и мозгового вещества, достигая отличий в 10 и более раз (табл. 6).

ТК были часто солокализованы с клетками, экспрессирующими гладкомышечный актин. Такими клетками могли быть как гладкие миоциты в составе стенки сосудистого русла почки, так и миофибробласты, количество которых возрастало в зонах с фиброзными изменениями.

Таблица 5
Содержание α -SMA- и виментинпозитивных клеток и структур в почке
Table 5
Content of α -SMA- and vimentin-positive cells and structures in the kidney

Зоны почки	Виментин				α -SMA			
	Иммунонегативные структуры		Иммунопозитивные структуры		Иммунонегативные структуры		Иммунопозитивные структуры	
	%	Площадь (мм ²)	%	Площадь (мм ²)	%	Площадь (мм ²)	%	Площадь (мм ²)
Зона фиброза	45,8	2,43	54,2	2,83	45,5	2,15	54,5	2,83
Корковое вещество	77,6	8,83	22,4	2,63	86,2	9,47	13,8	1,37
Мозговое вещество	63,2	5,37	36,8	3,07	89,1	7,84	10,9	0,93

Таблица 6
Экспрессия триптазы в ядрах клеток различных областей почки
Table 6
Tryptase expression in the cell nuclei of different regions of the kidney

Иммунопозитивность ядерных структур к триптазе	Корковое вещество	Мозговое вещество	Зона фиброза
	% от общего количества ядер	% от общего количества ядер	% от общего количества ядер
Умеренная (+)	0,0225	0,0250	0,3425
Выраженная (++)	0,0073	0,0055	0,1025

Результаты эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопий позволили оценить пространственную ориентацию воздействия секрета ТК, в частности триптазы и карбоксипептидазы А3, на структурные компоненты эпителия различных участков нефрона. Оказалось, что секреция протеазосодержащих компонентов могла происходить на довольно обширной площади базальной мембраны как проксимального, так и дистального извитых канальцев нефрона. Не вызывает сомнения, что данное воздействие специфических протеаз сопровождалось значительными изменениями деятельности эпителия отделов нефронов. С другой стороны, было выявлено, что ТК способны одновременно оказывать свое влияние на несколько мишеней локального тканевого микроокружения, фактически синхронизируя индуцируемые изменения соответствующих сигнальных систем во многих клетках (рис. 2–5).

Методика: рис. 5, А–D: иммуногистохимическое окрашивание химазы ТК.

Рис. 5, E: окрашивание толуидиновым синим.

Рис. 5, F: окрашивание раствором Гимзы.

Рис. 5, G: двойное иммуномаркирование триптазы и химазы.

Рис. 5, A: накопление химазы в зрелой фиброзной ткани (указано стрелкой) на границе с корковым веществом почки.

Рис. 5, B, C: таргетная секреция химазы к базальной мембране эпителия проксимальных (B – указано стрелкой) и дистальных (C – указано стрелкой) отделов нефрона почки.

Рис. 5, D, E: направленная дегрануляция ТК к фибробластам в зоне фиброзных изменений (указано стрелкой).

Рис. 5, F: ТК на периферии профиброгенной ниши с активной секреторной деятельностью (указано стрелкой).

Рис. 5, G: контактирующие участки цитоплазмы ТК, заполненные крупными секреторными гранулами с преимущественной локализацией триптазы и химазы по периферии гранул.

Шкала: А – 50 мкм, остальные – 5 мкм.

Образование большой площади соприкосновения ТК с другими клетками позволяло потенцировать биологические эффекты триптазы, карбоксипептидазы А3 и химазы (рис. 4, J, K). Как правило, в области фиброза ТК оказывали одновременное влияние на большее количество других клеток локального тканевого микроокружения по сравнению с корковым или мозговым веществом почки. В некоторых случаях ТК могли осуществлять направленную секрецию протеаз одновременно к 8 и более клеткам с учетом толщины гистологического среза (рис. 4, C, J, K).

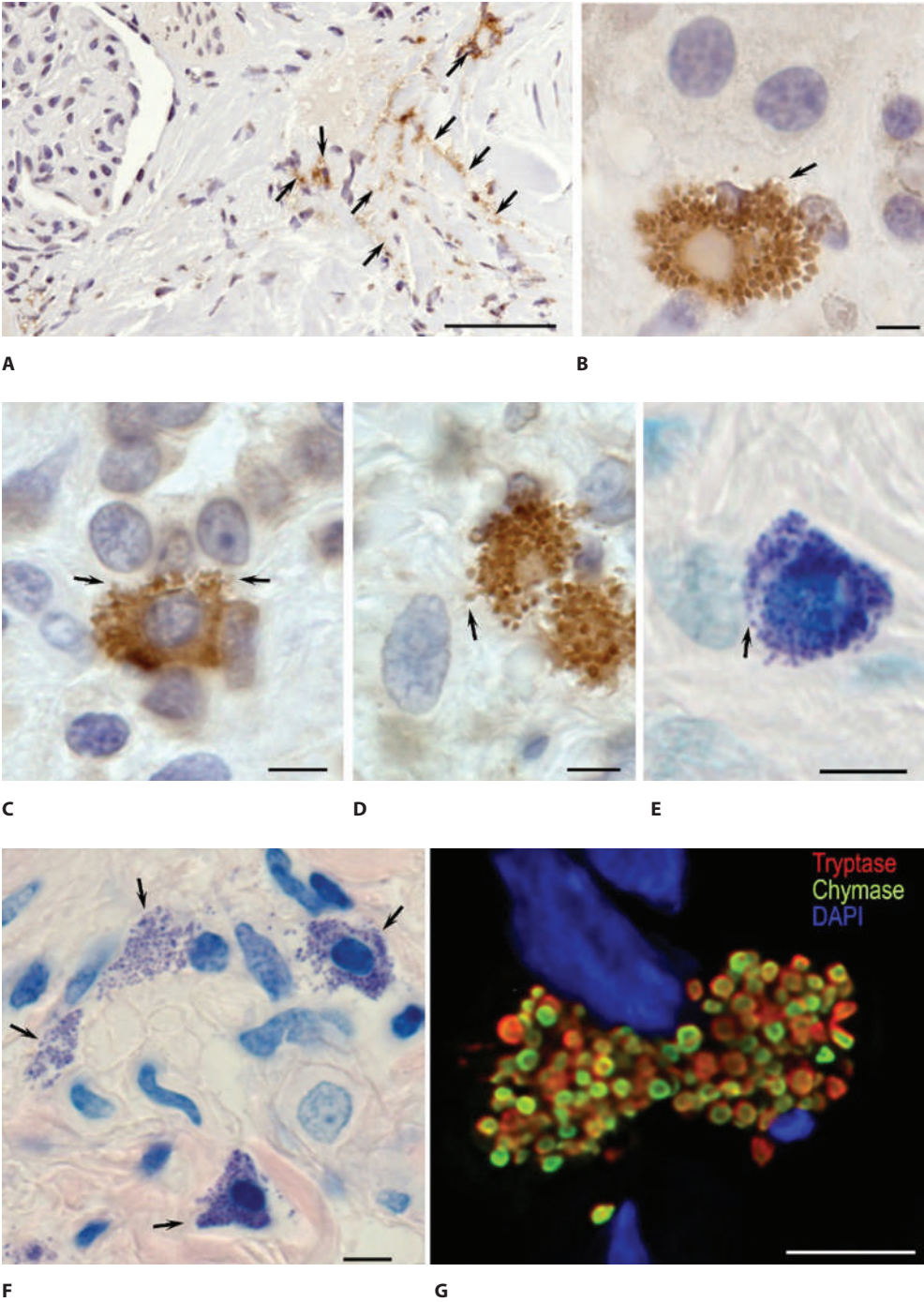


Рис. 5. Тучные клетки в формировании профиброзных изменений почки
Fig. 5. Mast cells in profibrotic changes formation in the kidney

■ ОБСУЖДЕНИЕ

С точки зрения патобиологии фиброз рассматривается как защитная реакция организма, направленная на изоляцию очага воспаления от окружающих тканей и системного кровотока. Фиброзное замещение тканей приводит к постепенной утрате их специфических функций и при достижении определенных масштабов интегральной дисфункции органа. Причинами таких изменений могут быть облучение, травма, инфекционно-аллергические, аутоиммунные и воспалительные процессы. Повреждение почки может вести к формированию особого статуса интегративно-буферной метаболической среды тканевого микроокружения, претерпевающего динамические изменения своего состава и содержания в процессе регенерации и ремоделирования внеклеточного матрикса и пространственной архитектоники органа. Для структурной конкретизации таких изменений тканевого микроокружения ранее был удачно предложен термин фиброгенной ниши, отражающий активацию фибробластов и генез миофибробластов при фиброзе органов [34].

Одним из механизмов образования фиброза является эпителиально-мезенхимальный переход, при котором эпителиальные клетки приобретают фенотипические свойства мезенхимальных клеток. Результаты нашего исследования почки пациента с распространенным нефрофиброзом свидетельствуют о непосредственном участии ТК в формировании фиброгенных ниш и активном содействии прогрессированию фиброза с помощью нескольких механизмов.

Прежде всего, необходимо отметить, что ТК с помощью специфических протеаз образуют провоспалительный фон в локальном тканевом микроокружении почки. Временные и пространственные закономерности секреции триптазы в локальном тканевом микроокружении почки при активации ТК являются важнейшим патогенетическим событием для развития воспалительного процесса и дальнейшего формирования профиброгенной ниши. При этом хроническая активация ТК может индуцировать стойкую повышенную чувствительность к ряду компонентов специфического тканевого микроокружения вследствие перестройки собственного рецепторного аппарата, что провоцирует более высокую секрецию биогенных аминов, цитокинов и специфических протеаз [33, 35, 36].

Триптаза ТК характеризуется высокой биологической активностью, затрагивая состояние многих клеточных и неклеточных компонентов тканевого микроокружения [9, 27, 37, 38]. Ряд исследований показал тесную вовлеченность триптазы в процессы ангиогенеза [39, 40], который сочетается с ремоделированием соединительной ткани, секрецией факторов роста, цитокинов и хемокинов, матриксных металлопротеиназ [41].

Фиброз почки сопровождается увеличением содержания миофибробластов, более трети которых происходит из эпителиальных клеток канальцев [42, 43]. Известны эффекты триптазы по отношению к клеткам фибробластического дифферона, вызывающие их активную миграцию, митотическое деление, стимуляцию синтеза коллагеновых белков. Таким образом, эффекты триптазы могут способствовать фиброзу почки. Повышение экспрессии гладкомышечного актина, показанное в нашем исследовании, подтверждает увеличение численности миофибробластов в местах фиброзных изменений и высокую интенсивность эпителиомезенхимального перехода под воздействием специфических протеаз ТК.

Кроме того, триптаза обладает высокой тропностью к рецепторам PAR-2 на различных клетках специфического тканевого микроокружения, потенцируя развитие воспаления [41]. Важным регуляторным механизмом триптазы в потенцировании воспаления является стойкое повышение экспрессии рецептора PAR-2 в клетках-мишенях [39, 44, 45].

Химаза играет важную роль в сигнальных молекулярно-клеточных интегративных механизмах специфического тканевого микроокружения [27, 38, 41]. Химаза способствует рекрутированию иммунокомпетентных клеток в различных условиях из микроциркуляторного русла в ткани. Имеются данные о возрастании под действием химазы накопления различных типов воспалительных клеток, в том числе эозинофилов, что мы наблюдали в проведенном исследовании [41, 46]. Химаза оказывает прямое воздействие на активность различных компонентов внеклеточного матрикса, обладая большим деструктивным потенциалом по сравнению с триптазой [41, 47, 48].

Показана корреляция количества химазапозитивных клеток с прогрессированием заболеваний воспалительного генеза различных органов, включая и почки [47, 49]. Провоспалительные эффекты химазы связаны с активацией цитокинов и факторов роста, в том числе ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18, TRF- β , эндотелина-1 и -2, нейтрофилактивирующего протеина-2 и др., что приводит к рекрутингу гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов в тканевое микроокружение [47]. Химаза может вызывать деградацию контактов и структур, обеспечивающих прочность прикрепления эпителиоцитов друг к другу и базальной мембране, что косвенно может способствовать эпителио-мезенхимальной трансформации.

Однако особо важное значение имеет роль химазы в биогенезе коллагена. С одной стороны, химаза индуцирует интенсификацию митотической активности фибробластов вместе с их биосинтетическим потенциалом. С другой стороны, химаза принимает участие в модификации молекул проколлагена, стимулируя образование коллагеновых фибрилл [41, 50]. Проведенные исследования свидетельствуют о тесном участии ТК в механизмах фибриллогенеза, которое проявляется индуктивным влиянием на полимеризацию субъединиц волокнистого компонента тканевого микроокружения, прежде всего, в перичеллюлярном пространстве клеток фибробластического дифферона. Также в непосредственной близости к плазмалемме ТК показано наличие ретикулярных волокон или точек инициации фибриллогенеза [29, 31, 32].

Несмотря на обилие СРАЗ в ТК, в настоящее время отмечается дефицит знаний о ее биологических эффектах по сравнению с другими специфическими протеазами ТК – триптазой и химазой [32, 38, 51]. Предполагается важное значение СРАЗ в биогенезе волокнистого компонента внеклеточного матрикса и ремоделировании внеклеточного матрикса. С одной стороны, комплекс СРАЗ – химаза может приводить к возрастанию митотической активности фибробластов вместе с их биосинтетическим потенциалом. С другой стороны, данный комплекс или протеазы по отдельности могут принимать участие в модификации молекул проколлагена, индуцируя образование коллагеновых фибрилл [41, 50]. Ранее мы показали активное участие ТК в механизмах фибриллогенеза, которое проявляется стимулированием полимеризации субъединиц волокнистого компонента тканевого микроокружения, прежде всего, в непосредственной близости к клеточным представителям фибробластического дифферона [29, 32].

Посттрансляционные модификации гистонов приводят к активации или подавлению целевых генов вследствие модулирования связывания транскрипционных агентов с их соответствующими промоторными элементами ядра [52]. В ряде исследований показано, что модификации гистонов играют важную роль в развитии и прогрессировании почечного фиброза [53]. Ацетилирование гистонов регулируется несколькими семействами белков, в том числе гистонацетилтрансферазы и деацетилазы гистонов. Эти модификаторы ацетилирования участвуют во множестве патофизиологических процессов, ведущих к развитию почечного фиброза, включая частичный эпителиально-мезенхимальный переход, активацию почечных фибробластов, воспалительную реакцию и экспрессию профиброзных факторов [54].

Кроме того, ускорение экспрессии коллагена COL1A1/COL1A2 может регулироваться с помощью модификации гистонов под воздействием различных физиологических и патологических процессов [54]. Модификации гистонов стимулируют процесс эпителиомезенхимального перехода (ЭМП), способствующего трансформации эпителия канальцев нефрона в клетки стромы. Данный механизм при хронической почечной недостаточности приводит к дисфункции всех отделов нефрона [55]. Образующиеся при ЭМП активированные миофибробласты, возникающие из эпителия нефрона, могут играть основную роль при развивающемся фиброзе почки, обеспечивая избыточное образование внеклеточного матрикса [56]. Несмотря на то, что общепринятым, наиболее вероятным механизмом, связанным с развитием фиброза, является трансформация нарушенных трубчатых эпителиальных клеток в мезенхимальные, точные механизмы еще не открыты. Фиброз почки сопровождается увеличением содержания миофибробластов, более трети которых происходит из эпителиальных клеток канальцев [42, 43]. Возрастание экспрессии гладкомышечного актина, показанное в нашем исследовании, подтверждает повышение числа миофибробластов в местах фиброзных изменений и высокую интенсивность эпителиомезенхимального перехода. Аналогичную ситуацию наблюдали и в других органах, в частности в легких [57].

Результаты выполненной работы косвенно подтверждают участие специфических протеаз ТК в эпителиомезенхимальной трансформации. Действительно, хорошо известен факт эпигенетической регуляции триптазой состояния гистонов ядра [58–60]. Возможно, что ЭМП реализуется благодаря воздействию триптазы, о чем ранее не было свидетельств в доступной литературе. Исследование фундаментального значения транспорта триптазы в ядра клеток показало способность протеазы проводить процессинг коровых гистонов в N-концевом хвосте и изменять процессы транскрипции [58–60]. При этом ферментативная активность триптазы в ядре стабилизируется молекулами ДНК, что позволяет длительно регулировать состояние гистонов [47, 58, 60].

Данный принцип регуляции эпигенетической модификации коровых гистонов представляет собой особые функции триптазы ТК человека [51]. Тесная солокализация СРАЗ с триптазой, которую мы выявили в своих исследованиях, создает предпосылки к участию карбоксипептидазы АЗ в некоторых эпигенетических эффектах [32].

В нашей работе формирование определенных зон клеток с содержанием триптазы указывает на возможные механизмы участия протеазы в эпителиально-мезенхимной трансформации. При этом волнообразно протекающий процесс затрагивает на первых этапах ограниченное количество клеток, которые, возможно, в последующем

становятся активными клеточными очагами повышенного синтеза компонентов внеклеточного матрикса.

Убедительные доказательства участия карбоксипептидазы АЗ в регуляции фиброзных ниш позволяют предположить неизвестные механизмы. Опираясь на известные факты о проявлении биологических эффектов СРАЗ в кооперации с химазой, можно также предположить важность данной протеазы в прогрессировании фиброзных изменений.

Таким образом, результаты проведенного анализа раскрывают роль ТК в генезе фиброзных изменений почек. Выявленные возможности создания провоспалительного фона специфического тканевого микроокружения и эпигенетической модификации гистонов с помощью триптазы открывают новый механизм прогрессирования тубулоинтерстициального фиброза почек, который обладает важными диагностическими критериями и позволяет определить будущие фармакологические мишени для профилактики и лечения заболевания. Образование локальных областей стромы с высоким содержанием триптазы, по своей сути, должно быть ограничено дополнительными структурными элементами, регулирующими скорость диффузии и их конечную концентрацию в строго ограниченном объеме ткани. На данную роль могут претендовать телоциты, обладающие важной функцией в организации и регуляции стромы почек [61, 62], однако данный вопрос требует дальнейшего тщательного анализа.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что наравне с выраженными фиброзными изменениями в почке пациента наблюдается мультилокулярный процесс генеза новых профиброгенных ниш, в которых принимают непосредственное участие ТК посредством секреции триптазы, химазы и карбоксипептидазы АЗ. ТК способны формировать индуцирующие эффекты локального тканевого микроокружения на фибробласты, воспаление, активность эпителиомезенхимального перехода и сосудистый гомеостаз в профиброгенных нишах. Определение молекулярно-биологических параметров ТК, в первую очередь ассоциированных с локусами воспаления, представляет собой инновационный подход к выявлению фундаментальных механизмов нефрофиброза. Биологическое значение ТК в образовании фиброгенных ниш может быть использовано не только для решения задач своевременной диагностики и эффективной терапии, но и для профилактики тубулоинтерстициального фиброза различной этиологии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Spiel W. Some critical comments on a systematic approach to diagnosis. Contribution to a documentation and classification system in child neuropsychiatry. *Acta Paedopsychiatr.* 1981;47(5):269–278.
2. Warady BA, Abraham AG, Schwartz GJ, Wong CS, Muñoz A, Betoko A, et al. Predictors of Rapid Progression of Glomerular and Nonglomerular Kidney Disease in Children and Adolescents: The Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) Cohort. *Am J Kidney Dis.* 2015;65(6):878–888. DOI: 10.1053/j.ajkd.2015.01.008
3. Warady BA, Chadha V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(12):1999–2009. DOI: 10.1007/s00467-006-0410-1
4. Morozov S.L., Mironova V.K., Dlin V.V. Post-hypoxic lesion of kidneys in babies. *Practical Medicine.* 2021;19(2):28–33. (in Russian)
5. Yang C-W, Harris DCH, Luyckx VA, Nangaku M, Hou FF, Garcia Garcia G, et al. Global case studies for chronic kidney disease/end-stage kidney disease care. *Kidney Int Suppl* (2011). 2020;10(1):e24–e48. DOI: 10.1016/j.kisu.2019.11.010

6. Wong CS, Pierce CB, Cole SR, Warady BA, Mak RHK, Benador NM, et al. Association of proteinuria with race, cause of chronic kidney disease, and glomerular filtration rate in the chronic kidney disease in children study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(4):812–819. DOI: 10.2215/CJN.01780408
7. Fathallah-Shaykh SA, Flynn JT, Pierce CB, Abraham AG, Blydt-Hansen TD, Massengill SF, et al. Progression of pediatric CKD of nonglomerular origin in the CKiD cohort. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(4):571–577. DOI: 10.2215/CJN.07480714
8. Bogdanova N.A., Kirillov V.I., Morozov S.L. Early markers of reflux nephropathy in children. *Practical Medicine*. 2017;10(111):43–48. (in Russian)
9. Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Johansen K, et al. 'United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2012;59(Suppl 1)(A7):e1–420. DOI: 10.1053/j.ajkd.2011.11.015
10. Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(6):901–909. DOI:10.1007/s00467-011-1992-9
11. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int*. 2005;67(2):404–419. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x
12. Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H, Grund KE, Wehrmann M, Batz C, et al. The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract*. 1990;186(1):135–144. DOI: 10.1016/S0344-0338(11)81021-6
13. Li L, Fu H, Liu Y. The fibrogenic niche in kidney fibrosis: components and mechanisms. *Nat Rev Nephrol*. 2022;18(9):545–557. DOI: 10.1038/s41581-022-00590-z
14. Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, Ortiz A, Rodrigues-Diez RR. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(5):269–288. DOI: 10.1038/s41581-019-0248-y. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41581-019-0248-y>.
15. Bülow RD, Boor P. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem*. 2019;67(9):643–661. DOI: 10.1369/0022155419849388. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1369/0022155419849388>.
16. Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2020;58(3):342–365. DOI: 10.1007/s12016-019-08769-2. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12016-019-08769-2>.
17. Sato Y, Yanagita M. Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflamm Regen*. 2017;37:17. DOI: 10.1186/s41232-017-0048-3
18. Wei J, Xu Z, Yan X. The role of the macrophage-to-myofibroblast transition in renal fibrosis. *Front Immunol*. 2022;13:934377. DOI: 10.3389/fimmu.2022.934377
19. Li H-Y, Zhang X, Zhou T, Zhong Z, Zhong H. Efficacy and safety of cyclosporine a for patients with steroid-resistant nephrotic syndrome: a meta-analysis. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):384. DOI: 10.1186/s12882-019-1575-8. Available at: <https://bmcnephrol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12882-019-1575-8>.
20. Chen P-S, Li Y-P, Ni H-F. Morphology and Evaluation of Renal Fibrosis. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1165:17–36. DOI: 10.1007/978-981-13-8871-2_2
21. Theoharides TC, Alysandratos K-D, Angelidou A, Delivanis D-A, Sismanopoulos N, Zhang B, et al. Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(1):21–33. DOI: 10.1016/j.bbdis.2010.12.014. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443910002929>.
22. Valent P, Akin C, Hartmann K, Nilsson G, Reiter A, Hermine O, et al. Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. *Theranostics*. 2020;10(23):10743–10768. DOI: 10.7150/thno.46719. Available at: <https://www.thno.org/v10p10743.htm>.
23. Kolkhir P, Elieh-Ali-Komi D, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Understanding human mast cells: lesson from therapies for allergic and non-allergic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(5):294–308. DOI: 10.1038/s41577-021-00622-y. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41577-021-00622-y>.
24. Komi DEA, Redegeld FA. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2020;58(3):313–325. DOI: 10.1007/s12016-019-08753-w. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12016-019-08753-w>.
25. Galli SJ, Gaudenzio N, Tsai M. Mast Cells in Inflammation and Disease: Recent Progress and Ongoing Concerns. *Annu. Rev. Immunol*. 2020;38(1):49–77. DOI: 10.1146/annurev-immunol-071719-094903. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-071719-094903>.
26. Owens EP, Vesey DA, Kassianos AJ, Healy H, Hoy WE, Gobe GC. Biomarkers and the role of mast cells as facilitators of inflammation and fibrosis in chronic kidney disease. *Transl. Androl. Urol*. 2019;8(52):S175–S183. DOI: 10.21037/tau.2018.11.03. Available at: <http://tau.amegroups.com/article/view/22677/23965>.
27. Atiakshin D, Buchwalow I, SamoiloVA V, Tiemann M. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells. *Histochem Cell Biol*. 2018;149(5):461–477. DOI: 10.1007/s00418-018-1659-8. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-018-1659-8>.
28. Buchwalow I.B., Boecker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. 1st ed. Springer; Heidelberg, Germany; Dordrecht, The Netherlands: London, UK: New York, NY, USA: 2010.
29. Buchwalow I, SamoiloVA V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep*. 2011;1:28. DOI: 10.1038/srep00028
30. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878. DOI: 10.1038/s41598-017-17204-5
31. Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol*. 2019;152(4):253–269. DOI: 10.1007/s00418-019-01803-6. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-019-01803-6>.
32. Atiakshin D, Kostin A, Trotsenko I, SamoiloVA V, Buchwalow I, Tiemann M. Carboxypeptidase A3-A Key Component of the Protease Phenotype of Mast Cells. *Cells*. 2022;11(3):570. DOI: 10.3390/cells11030570
33. Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol*. 2017;26(9):751–759. DOI: 10.1111/exd.13288. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.13288>.
34. Fu H, Tian Y, Zhou L, Zhou D, Tan RJ, Stolz DB, et al. Tenascin-C Is a Major Component of the Fibrogenic Niche in Kidney Fibrosis. *JASN*. 2017;28(3):785–801. DOI: 10.1681/ASN.2016020165. Available at: <https://journals.lww.com/00001751-201703000-00012>.
35. Zhang Z, Kurashima Y. Two Sides of the Coin: Mast Cells as a Key Regulator of Allergy and Acute/Chronic Inflammation. *Cells*. 2021;10(7):1615. DOI: 10.3390/cells10071615
36. González-de-Olano D, Álvarez-Twose I. Mast Cells as Key Players in Allergy and Inflammation. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2018;28(6):365–378. DOI: 10.18176/jiaci.0327. Available at: <http://www.jiaci.org/summary/vol28-issue6-num1693>.

37. O'Connell MP, Lyons JJ. Resolving the genetics of human tryptases: implications for health, disease, and clinical use as a biomarker. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*. 2022;22(2):143–152. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000813. Available at: <https://journals.lww.com/10.1097/ACI.0000000000000813>.
38. Hellman L, Akula S, Fu Z, Wernersson S. Mast Cell and Basophil Granule Proteases – In Vivo Targets and Function. *Front. Immunol*. 2022;13:918305. DOI: 10.3389/fimmu.2022.918305. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.918305/full>.
39. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol*. 2015;63(1):18–24. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.04.001
40. Longo V, Tamma R, Brunetti O, Pisconti S, Argentiero A, Silvestris N, et al. Mast cells and angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Exp Med*. 2018;18(3):319–323. DOI: 10.1007/s10238-018-0493-6. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10238-018-0493-6>.
41. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast Cell Proteases. *Advances in Immunology*. Elsevier; 2007;(95). P. 167–255. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277607950063>.
42. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002;110(3):341–350. DOI: 10.1172/JCI15518
43. Ribatti D, Tamma R. Giulio Gabbiani and the discovery of myofibroblasts. *Inflamm. Res*. 2019;68(3):241–245. DOI: 10.1007/s00011-018-01211-x. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-018-01211-x>.
44. Chimenti MS, Sunzini F, Fiorucci L, Botti E, Fonti GL, Conigliaro P, et al. Potential Role of Cytochrome c and Tryptase in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis: Focus on Resistance to Apoptosis and Oxidative Stress. *Front Immunol*. 2018;9:2363. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02363
45. Lucena F, McDougall JJ. Protease Activated Receptors and Arthritis. *IJMS*. 2021;22(17):9352. DOI: 10.3390/ijms22179352. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/17/9352>.
46. He S, Walls AF. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo: Chymase induced cell accumulation. *British Journal of Pharmacology*. 1998;125(7):1491–1500. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702223. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0702223>.
47. Pejler G. Novel Insight into the in vivo Function of Mast Cell Chymase: Lessons from Knockouts and Inhibitors. *J Innate Immun*. 2020;12(5):357–372. DOI: 10.1159/000506985
48. Takai S, Jin D. Pathophysiological Role of Chymase-Activated Matrix Metalloproteinase-9. *Biomedicines*. 2022;10(10):2499. DOI: 10.3390/biomedicines10102499
49. Vibhushan S, Bratti M, Montero-Hernández JE, El Ghoneimi A, Benhamou M, Charles N, et al. Mast Cell Chymase and Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):302. DOI: 10.3390/ijms22010302
50. Dell'Italia LJ, Collawn JF, Ferrario CM. Multifunctional Role of Chymase in Acute and Chronic Tissue Injury and Remodeling. *Circ Res*. 2018;122(2):319–336. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310978
51. Akula S, Hellman L, Avilés FX, Wernersson S. Analysis of the mast cell expressed carboxypeptidase A3 and its structural and evolutionary relationship to other vertebrate carboxypeptidases. *Dev Comp Immunol*. 2022;127:104273. DOI: 10.1016/j.dci.2021.104273
52. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular Signals of Epigenetic States. *Science*. 2010;330(6004):612–616. DOI: 10.1126/science.1191078. Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1191078>.
53. Sun J, Wang Y, Cui W, Lou Y, Sun G, Zhang D, et al. Role of Epigenetic Histone Modifications in Diabetic Kidney Disease Involving Renal Fibrosis. *Journal of Diabetes Research*. 2017;2017:1–11. DOI: 10.1155/2017/7242384. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2017/7242384/>.
54. Shen F, Zhuang S. Histone Acetylation and Modifiers in Renal Fibrosis. *Front. Pharmacol*. 2022;13:760308. DOI: 10.3389/fphar.2022.760308. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.760308/full>.
55. Wang J, Li J, Zhang X, Zhang M, Hu X, Yin H. Molecular mechanisms of histone deacetylases and inhibitors in renal fibrosis progression. *Front. Mol. Biosci*. 2022;9:986405. DOI: 10.3389/fmolb.2022.986405. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.986405/full>.
56. Yuan Q, Tan RJ, Liu Y. Myofibroblast in Kidney Fibrosis: Origin, Activation, and Regulation. Liu B-C, Lan H-Y, Lv L-L, editors. *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*. Singapore: Springer Singapore; 2019. P. 253–283. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1165). Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-8871-2_12.
57. Kondratyuk RB, Grekov IS, Seleznev EA. Microenvironment influence on the development of epithelial-mesenchymal transformation in lung cancer. *Vestn. Ross. univ. družby nar., Ser. Med*. 2022;26(3):325–337. DOI: 10.22363/2313-0245-2022-26-3-325-337. Available at: <https://journals.rudn.ru/medicine/article/view/32234>.
58. Melo FR, Vita F, Berent-Maoz B, Levi-Schaffer F, Zabucchi G, Pejler G. Proteolytic histone modification by mast cell tryptase, a serglycin proteoglycan-dependent secretory granule protease. *J Biol Chem*. 2014;289(11):7682–7690. DOI: 10.1074/jbc.M113.546895
59. Melo FR, Wallerman O, Paivandy A, Calounova G, Gustafson A-M, Sabari BR, et al. Tryptase-catalyzed core histone truncation: A novel epigenetic regulatory mechanism in mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;140(2):474–485. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.11.044. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674917300386>.
60. Alanazi S, Rabelo Melo F, Pejler G. Tryptase Regulates the Epigenetic Modification of Core Histones in Mast Cell Leukemia Cells. *Front Immunol*. 2021;12:804408. DOI: 10.3389/fimmu.2021.804408
61. Sanches BDA, Tamarindo GH, Maldarino JDS, Da Silva ADT, Dos Santos VA, Góes RM, et al. Telocytes of the male urogenital system: Interrelationships, possible functions, and pathological implications. *Cell Biol Int*. 2021;45(8):1613–1623. DOI: 10.1002/cbin.11612. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbin.11612>.
62. Wolnicki M, Aleksandrovych V, Gil K. Interstitial cells of Cajal and telocytes in the urinary system: facts and distribution. *Folia Med Cracov*. 2016;56(4):81–89.