

РОЛЬ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ И ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОГНОЗА ГЛОМЕРУЛОПАТИЙ С ЭКСТРАКАПИЛЛЯРНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ

Дмитриева М. В., Летковская Т. А., Савош В. В., Брагина З. Н.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Цель. Оценить экспрессию иммунных комплексов, выявляемых методом иммунофлюоресценции, для установления диагноза и прогнозирования течения гломерулопатий с экстракапиллярной пролиферацией.

Материал и методы. 165 нефробиопсий с полулуниями в клубочках проанализированы при световой и люминесцентной микроскопии.

Результаты. В работе описаны особенности экспрессии иммунных комплексов при разных формах гломерулопатий и их значение для течения заболевания. Депозиты IgG при IgA нефропатии повышали риск нарушения функции почек в 2,68 раза (95% ДИ 1,13-6,33). При малоиммунных гломерулонефритах IgG сопряжены с более высоким процентом сегментарного гломерулосклероза ($p=0,020$), отсутствие IgM повышало риск прогрессии в 3,15 раза (95% ДИ 1,43-6,94). IgM чаще определялись при IgA нефропатии, чем при IgA васкулите ($p=0,049$).

Выводы. Исследование нефробиоптата с применением иммунофлюоресценции важно для установления диагноза и прогноза течения гломерулопатий с экстракапиллярной пролиферацией.

Ключевые слова: гломерулопатии, полулуния, иммунофлюоресценция, иммунные комплексы, прогноз.

Для цитирования: Роль иммунофлюоресценции в диагностике и определении прогноза гломерулопатий с экстракапиллярной пролиферацией / М. В. Дмитриева [и др.] // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18, № 6. С. 664-668. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-6-664-668>.

Введение

Большинство первичных и вторичных форм гломерулопатий (ГП) – иммунные по природе, хотя в настоящее время об этиологических агентах данных заболеваний известно далеко не все. Развитие экстракапиллярной пролиферации (ЭП) (син. полулуний) может наблюдаться при самых разнообразных ГП, в диагностике которых широко применяются серологические маркеры (анти-ГБМ антитела, антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АНЦА), антитела к двуспиральной ДНК, антинуклеарные антитела и другие). Тем не менее, одним из важных этапов диагностического процесса является морфологическое исследование образцов почечной ткани с иммунофлюоресцентной (ИФ) оценкой экспрессии иммунных комплексов (ИК), включающей определение локализации, характера и интенсивности экспрессии всего спектра исследуемых антител в клубочковых структурах. Несмотря на то, что в настоящее время четко определен спектр и характер экспрессии антител в ткани почки для диагноза каждой формы ГП с ЭП, немаловажное значение придается выявлению тех ИК, которые могут указывать на особенности течения нефрита и прогноз. На сегодняшний день в отечественной и зарубежной литературе широко изучаются клинические [2, 3] и морфологические [4] предикторы течения ГП. При этом данные о прогностическом значении результатов ИФ весьма противоречивы и исследованы недостаточно, а их клиническому значению уделяется неоправданно мало внимания [5, 6].

Цель исследования – оценить экспрессию ИК, выявляемых методом ИФ для установления диагноза и прогнозирования течения ГП с ЭП.

Материал и методы

Исследованы 165 нефробиопсий с ЭП в клубочках у взрослых пациентов за период 2011-2015 гг. в УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» г. Минска. Срезы образцов ткани почки окрашивали гематоксилином-эозином, реактивом Шиффа, трихромом по Массону, конго-красным, серебром по Джонсу. Проведено прямое ИФ исследование на выявление иммуноглобулинов (Ig) классов G, A, M, компонентов комплекса C3c и C1q, фибриногена, κ (каппа) и λ (лямбда) легких цепей (Polyclonal Rabbit Anti-Human/FITC, Dako, Denmark). Динамическое наблюдение проведено за 104 пациентами в течение (Me (25%-75%)) 14 (5-32) месяцев.

Прогностическая роль экспрессии маркеров при ИФ была изучена у пациентов с IgA нефропатией (IgАН), IgA васкулитом (IgAB) и малоиммунными гломерулонефритами (МИГН). Прогностический анализ не проводился в случаях анти-ГБМГН, мембранопротролиферативного гломерулонефрита (МБПГН) из-за относительно малой выборки ($n=5$ и $n=10$, соответственно) и при волчаночном гломерулонефрите (ВГН), поскольку при данной нозологии экспрессия всех исследуемых маркеров является диагностическим критерием.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета программ Excel 2010 и Statistica 10.0 для непараметрических данных. Для определения прогностической значимости экспрессии ИФ маркеров исследован показатель относительного риска (ОР) нарушения функции почек.

Результаты и обсуждение

Анти-ГБМГН установлен в 5 (3%) случаях,

основным ИФ признаком было выявление IgG в виде линейного паттерна в базальных мембранах клубочков. Этот признак наблюдался только в относительно неповрежденных участках мембран (рис. 1А), при наличии обширных клубочковых некрозов, циркулярных полулуний и гломерулосклероза экспрессия IgG выглядела прерывистой (рис. 1Б).

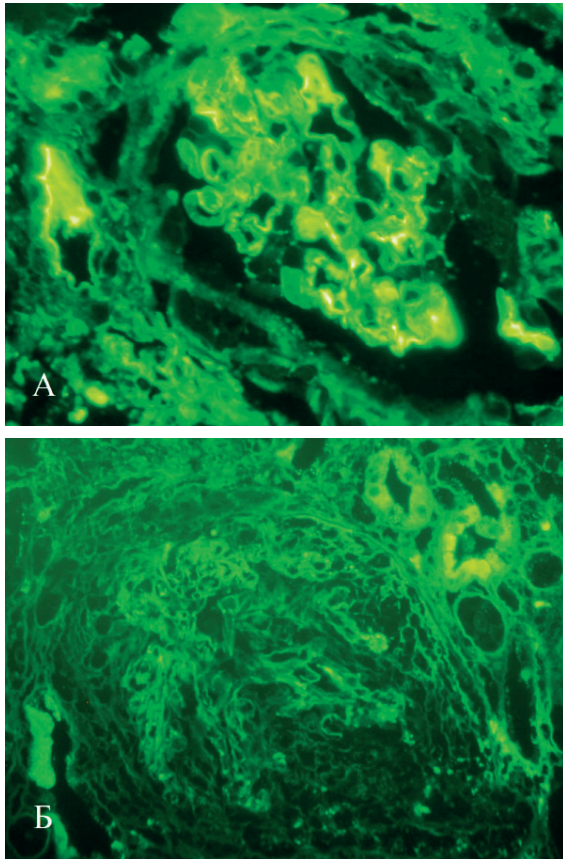


Рисунок 1. – А – линейные депозиты IgG в базальных мембранах клубочков (ув.×200), Б – прерывистая экспрессия IgG (ув.×200)

Figure 1. – A – linear IgG deposits in the glomerular basement membranes (×200), B – intermittent IgG expression (×200)

Случаи с ИК формами ГП составили большую часть (119/72,1%) наблюдений и характеризовались мезангиальной пролиферацией с гломерулярными депозитами в мезангиальном матриксе и базальных мембранах (субэндотелиально и субэпителиально), при этом паттерн повреждения варьировал как между нозологическими формами, так и внутри них.

Доминантная и/или кодоминантная экспрессия IgA в клубочковом компартменте свидетельствовала об IgAN (n=64/38,8%) либо об IgAV (n=11/6,7%) [7], рассматриваемыми некоторыми авторами как одно заболевание с локальными либо системными проявлениями [8]. Иммуные комплексы определялись в виде нежных гранул в мезангиальных зонах, парамезангиально и интрамембранозно (рис. 2А). Яркое свечение депозитов IgA (3+) выявлено в подавляющем боль-

шинстве случаев (65/85,5%), в то время как слабая его интенсивность (1+) не наблюдалась ни в одном из случаев. Кроме IgA, обе формы демонстрировали клубочковые ко-депозиты IgG, IgM, C3с компонента комплемента, а также каппа и лямбда легких цепей. Выявлены также IgM, C3с и C1q в участках гломерулосклероза (рис. 2Б) и капсуле Шумлянско-Боумена (рис. 2В).

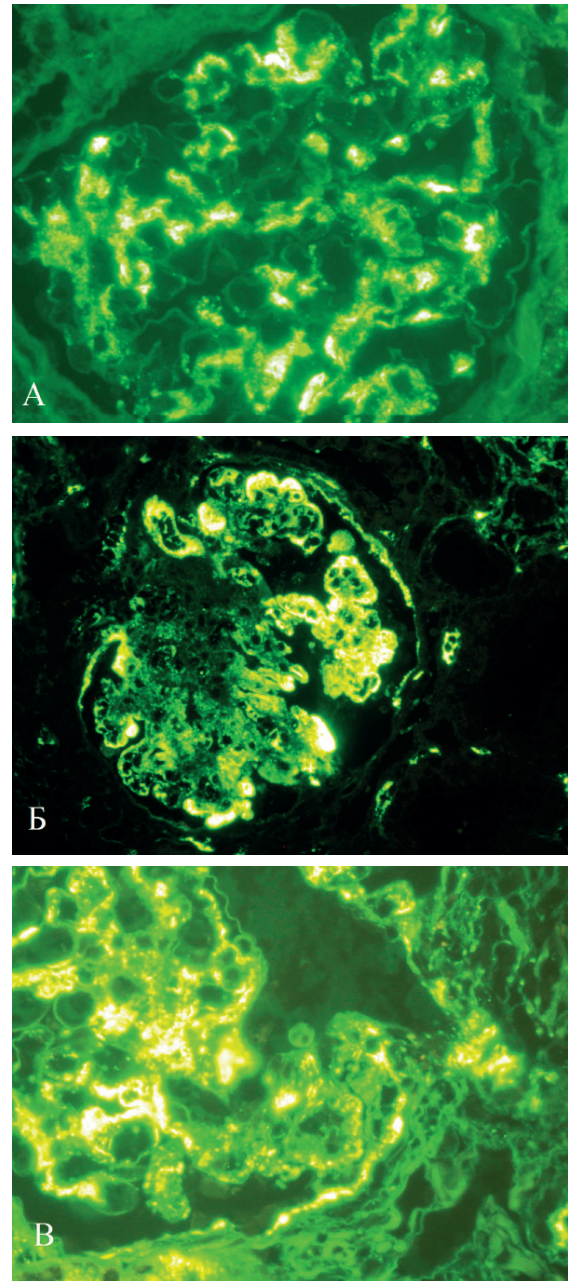


Рисунок 2. – Депозиты иммунных комплексов при IgAN и IgAV: А – IgA в мезангии и базальных мембранах (ув.×400), Б – IgM в мезангии, мембранах, участках гломерулосклероза и в капсуле клубочка (ув.×200), В – компонента комплемента C3 в мезангии, базальных мембранах и капсуле клубочка (ув.×400)

Figure 2. – Immune complex deposits in IgAN and IgAV: A – IgA in the glomerular mesangium and basement membranes (×400), B – IgM in mesangium, membranes, glomerulosclerosis and capsulae (×200); C – C3 complement component in mesangium, membranes and capsulae (×200)

При сравнении экспрессии ИК выявлено, что IgM в мезангии чаще определялся при IgAN, чем при IgAV ($\chi^2=0,035$, $p=0,049$), экспрессия остальных ИК достоверно не различалась ($p>0,05$). Экспрессия IgG в мезангиальных зонах клубочков ($\chi^2=4,92$, $p=0,027$) сопровождалась повышением риска снижения функции почек в 2,68 раза (95% ДИ 1,13-6,33), что соотносилось с результатами, полученными зарубежными авторами [9, 10].

При ВГН ($n=31/18,8\%$) в ткани почки определяли экспрессию всех исследованных антител («full house» паттерн), что является следствием системной аутоиммунизации, возникающей в результате генетически обусловленной иммунной дисрегуляции [11]. По характеру экспрессии ИК в структурах клубочков определяли морфологический класс нефрита [12]. ЭП наблюдалась в 9 (29%) случаях III класса ВГН, который характеризовался фокальным процессом с вовлечением менее половины представленных клубочков, и в 22 (71%) случаях IV класса с диффузным поражением (более 50% клубочков). Депозиты определяли в мезангии и базальных мембранах клубочков, зачастую в виде грубых включений и субэндотелиальных лентовидных участков (рис. 3).

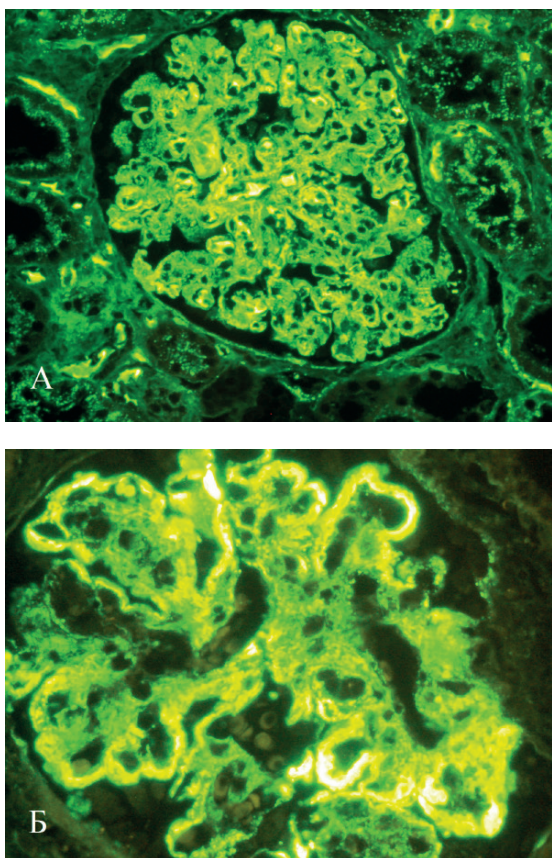


Рисунок 3. – депозиты иммунных комплексов при ВГН: А – IgG в базальных мембранах и мезангии (ув.×200); Б – C1q в мезангии и базальных мембранах (ув.×400)
Figure 3. – Immune complex deposits in MGN: A – IgG in the basement membranes and mesangium (×200), B – C1q in the mesangium and basement membranes (×400)

Морфологические изменения в биоптатах при МБПГН ($n=10/6,1\%$) характеризовались формированием дольчатости клубочков с утолщением и расщеплением базальных мембран в сочетании с мезангиальной пролиферацией. При ИФ исследовании в 9 из них наблюдалась экспрессия C3 компонента комплемента, IgG и IgM в базальных мембранах и мезангии с усилением экспрессии по периферии сосудистых долек (рис. 4).

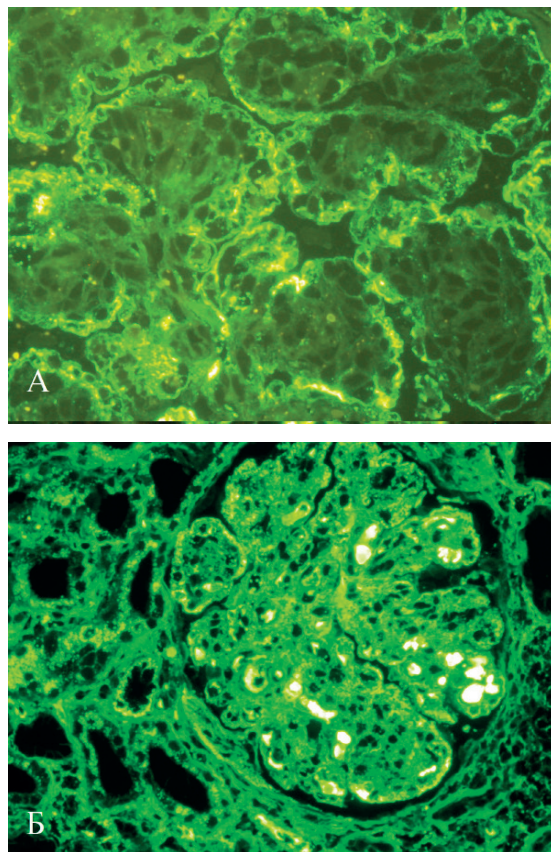


Рисунок 4. – Депозиты иммунных комплексов при МБПГН: А – C3 компонента комплемента (ув.×400), Б – IgG в мезангии и базальных мембранах (ув.×200)

Figure 4. – Immune complexes deposits in membranoproliferative GN: A – C3 complement component (×400), B – IgG in basement membranes and mesangium (×400)

Дифференциальная диагностика МБПГН от IV класса ВГН основывалась на клинической картине и отсутствии серологических маркеров ВГН. Один случай (0,6%) острого ГН при ИФ проявлялся гранулярными депозитами C3 компонента субэпителиальной локализации в виде паттерна «звездного неба». По одному случаю ВИЧ-ассоциированной нефропатии и поражении почек при криоглобулинемическом васкулите, ассоциированном с вирусным гепатитом С (0,6%), подтверждены соответствующими результатами серологического исследования. При этом первое заболевание сопровождалось экспрессией всех исследуемых маркеров по мембранопролиферативному типу, во втором преобладали гранулярные депозиты IgM и IgG в

мезангии, гломерулярных базальных мембранах и криоглобулах.

Отсутствие экспрессии каких-либо ИК в сочетании с ЭП в клубочках отмечено в 8 (4,8%) случаях фокального сегментарного гломерулосклероза, а в 33 (20%) случаях позволило предположить диагноз МИГН, который у большинства пациентов (24, 72,7%) был ассоциирован с наличием АНЦА в сыворотке крови. В клубочках 3 (9,1%) биопсий с МИГН ИК отсутствовали. Однако сам термин «малоиммунный» предполагает присутствие некоторых ИК в малых количествах, не позволяющих диагностировать иммунокомплексное повреждение почек [1]. В 2 (6,1%) случаях IgM и C3 выявлялись только в участках сегментарного гломерулосклероза, а в 28 (84,8%) – мезангиальная экспрессия некоторых депозитов и их комбинаций. Наиболее часто определяли иммуноглобулины класса М (26/78,8%), несколько реже – С3 компонент компонента (n=21/63,6%). При сравнении экспрессии ИК в клубочковых структурах с другими признаками клубочкового повреждения установлено, что экспрессия IgG и C1q в клубочках (мезангии и базальных мембранах) ассоциирована со статистически более высоким удельным весом сегментарного гломерулосклероза (U=65,5; p=0,020 и U=56,5; p=0,048, соответственно).

Наличие ИК в клубочках по-разному отражалось на прогрессировании МИГН. Экспрессия

IgG, IgA и C3 в мезангии и базальных мембранах клубочков (OR=0,63, 95%ДИ 0,28-1,41; OR=1,41, 95%ДИ 0,67-2,94 и OR=1,17, 95%ДИ 0,54-2,51 соответственно), а также IgM и C1q в участках сегментарного гломерулосклероза (OR=1,4; 95%ДИ 0,64-3,08 и OR=0,85, 95%ДИ 0,38-1,90, соответственно) не влияли на прогрессию заболевания, а отсутствие IgM статистически значительно повышало риск развития почечной недостаточности (OR=3,15, 95%ДИ 1,43-6,94).

Выводы

Идентификация ИК в виде определенного типа повреждения клубочковых структур почки – одно из важных звеньев установления нозологического диагноза ГП с ЭП. Кроме того, оценка экспрессии этих маркеров также важна для определения прогноза в отношении течения заболевания у конкретного пациента. Мезангиальная экспрессия IgG при IgAN ассоциирована с повышенным риском нарушения функции почек. Наличие депозитов IgM в мезангии чаще наблюдалось при IgAN, чем при системном IgA-ассоциированном поражении (IgAV). При МИГН мезангиальные депозиты IgG сопряжены с более высоким удельным весом сегментарного гломерулосклероза. В то же время отсутствие экспрессии IgM в этих случаях повышало риск прогрессии заболевания более чем в 3 раза.

Литература

- Jennette, J. C. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis / J. C. Jennette // *Kidney Int.* – 2003. – Vol. 63, № 3. – P. 1164-1177. – doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00843.x.
- Prognostic factors in crescentic glomerulonephritis. A single-center experience / R. Ozturk [et al.] // *Iran J of Kidney Dis.* – 2015. – Vol. 9, № 1. – P. 31-38.
- Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population / W. Le [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2012. – Vol. 27, №4. – P. 1479-1485. – doi: 10.1093/ndt/gfr527
- Histopathologic and clinical predictors of kidney outcomes in ANCA-associated vasculitis / S. L. Ford [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2014. – Vol. 63, № 2. – P. 227-235. – doi: 10.1053/j.ajkd.2013.08.025.
- Comprehensive evaluation of the significance of immunofluorescent findings on clinicopathological features in IgA nephropathy / R. Katafuchi [et al.] // *Clin Exp Nephrol.* – 2019. – Vol. 23, № 2. – P. 169-181. – doi: 10.1007/s10157-018-1619-6.
- Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis with immunoglobulin deposition / O. Hirose [et al.] // *Clin Exp Nephrol.* – 2017. – Vol. 21, № 4. – P. 643-650. – doi: 10.1007/s10157-016-1341-1.
- The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility / I. S. Roberts [et al.] // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 76, № 5. – P. 546-556. – doi: 10.1038/ki.2009.168
- Immune complexes in acute adult-onset Henoch-Schonlein nephritis / M. Hilhorst [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2011. – Vol. 26, № 12. – P. 3960-3967. – doi: 10.1093/ndt/gfr149.
- Characteristics of immunoglobulin A nephropathy with mesangial immunoglobulin G and immunoglobulin M deposition / T. Moriyama [et al.] // *Nephrology (Carlton).* – 2010. – Vol. 15, № 8. – P. 747-754. – doi: 10.1111/j.1440-1797.2010.01296.x.
- Clinical significance of IgG deposition in the glomerular mesangial area in patients with IgA nephropathy / Y. Wada [et al.] // *Clin Exp Nephrol.* – 2013. – Vol. 17, № 1. – P. 73-82. – doi: 10.1007/s10157-012-0660-0.
- Anders, H. J. Immunopathology of lupus nephritis / H. J. Anders, A. B. Fogo. *Semin. Immunopathol.* – 2014. – Vol. 36, № 4. – P. 443-459. – doi: 10.1007/s00281-013-0413-5.
- The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited / J. J. Weening [et al.] // *J Am Soc Nephrol.* – 2004. – Vol. 15, № 2. – P. 241-250. – doi: 10.1097/01.asn.0000108969.21691.5d.

References

- Jennette JC. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2003;63(3):1164-77. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00843.x.
- Ozturk R, Yenigun EC, Dede F, Koc E, Turgut D, Piskinpaşa SV, Ozkayar N, Odabas AR. Prognostic factors in crescentic glomerulonephritis: a single-center experience. *Iran J Kidney Dis.* 2015;9(1):31-8.
- Le W, Liang S, Hu Y, Deng K, Bao H, Zeng C, Liu Z. Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(4):1479-85. doi: 10.1093/ndt/gfr527.
- Ford SL, Polkinghorne KR, Longano A, Dowling J, Dayan S, Kerr PG, Holdsworth SR, Kitching AR, Summers SA. Histopathologic and clinical predictors of kidney outcomes in ANCA-associated vasculitis. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(2):227-35. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.08.025.

5. Katafuchi R, Nagae H, Masutani K, Tsuruya K, Mitsuiki K. Comprehensive evaluation of the significance of immunofluorescent findings on clinicopathological features in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2019;23(2):169-181. doi: 10.1007/s10157-018-1619-6.
6. Hirose O, Itabashi M, Takei T, Honda K, Nitta K. Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis with immunoglobulin deposition. *Clin Exp Nephrol.* 2017;21(4):643-650. doi: 10.1007/s10157-016-1341-1.
7. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn JA, Cattran DC, Coppo R, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F, Feehally J, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas M, Herzenberg AM, Hill PA, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int.* 2009;76(5):546-56. doi: 10.1038/ki.2009.168.
8. Hilhorst M, van Paassen P, van Breda Vriesman P, Cohen Tervaert JW. Immune complexes in acute adult-onset Henoch-Schonlein nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(12):3960-7. doi: 10.1093/ndt/gfr149.
9. Moriyama T, Shimizu A, Takei T, Uchida K, Honda K, Nitta K. Characteristics of immunoglobulin A nephropathy with mesangial immunoglobulin G and immunoglobulin M deposition. *Nephrology (Carlton).* 2010;15(8):747-54. doi: 10.1111/j.1440-1797.2010.01296.x.
10. Wada Y, Ogata H, Takeshige Y, Takeshima A, Yoshida N, Yamamoto M, Ito H, Kinugasa E. Clinical significance of IgG deposition in the glomerular mesangial area in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2013;17(1):73-82. doi: 10.1007/s10157-012-0660-0.
11. Anders HJ, Fogo AB. Immunopathology of lupus nephritis. *Semin Immunopathol.* 2014;36(4):443-59. doi: 10.1007/s00281-013-0413-5.
12. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(2):241-50. doi: 10.1097/01.asn.0000108969.21691.5d.

THE ROLE OF IMMUNOFLUORESCENCE IN DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF GLOMERULOPATHIES WITH EXTRACAPILLARY PROLIFERATION

Dmitrieva M. V., Letkovskaya T. A., Savosh V. V., Bragina Z. N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Objective. To evaluate the immune complex expression detected by immunofluorescence in order to establish the diagnosis and predict the course of glomerulopathies with extracapillary proliferation.

Material and methods. A total of 165 kidney biopsies with extracapillary proliferation were analyzed by light and luminescent microscopy.

Results. The immunofluorescence expression and its prognostic significance in glomerulopathies were described in the study. IgG deposits in IgA nephropathy increased the risk of impaired renal function by 2.68 times (95% CI 1.13-6.33). In pauci-immune glomerulonephritis, IgGs were associated with a higher segmental glomerulosclerosis percentage ($p=0.020$), the absence of IgM increased the risk of progression by 3.15 times (95% CI 1.43-6.94). IgM was more often detected in IgA nephropathy than in IgA vasculitis ($p=0.049$).

Conclusion. Kidney biopsy assessment using immunofluorescence is important for the diagnosis and prognosis of glomerulopathies with extracapillary proliferation.

Keywords: glomerulopathies, crescents, kidney biopsy, immune complexes, immunofluorescence, prognosis.

For citation: Dmitrieva MV, Letkovskaya TA, Savosh VV, Bragina ZN. The immunofluorescence role in diagnosis and prognosis of glomerulopathies with extracapillary proliferation. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2020;18(6):664-668. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-6-664-668>.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors

*Дмитриева Маргарита Владимировна / Dmitrieva Margarita, e-mail: mvdmitrieva@inbox.ru, ORCID: 0000-0002-2958-9424

Летковская Татьяна Анатольевна / Letkovskaya Tatyana, e-mail: talletkovskaya@mail.ru

Савош Виктория Викторовна / Savosh Viktoria, e-mail: vv.savosh@gmail.com

Брагина Зоя Николаевна / Bragina Zoia, e-mail: zn.bragina@gmail.com

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 24.07.2020

Принята к публикации / Accepted for publication: 17.11.2020