

Гломерулярные депозиты C4d-компонента комплемента при фокальном сегментарном гломерулосклерозе и IgM-нефропатии

(результаты исследования по выявлению C4d-компонента комплемента в биоптатах почки при различных нефропатиях)

А.В. Суханов¹, П. Кемпбелл², Ким Солес²

¹ НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ, г. Москва;

² Университет провинции Альберта, Эдмонтон, Канада

Glomerular deposition of C4d in focal segmental glomerulosclerosis and IgM-nephropathy

(results of C4d staining of kidney biopsies in native kidney diseases)

A.V. Sukhanov, P. Campbell, Kim Solez

Ключевые слова: C4d-компонент комплемента, фокальный сегментарный гломерулосклероз, IgM-нефропатия, липоидный нефроз.

Цель исследования. Выявление C4d-компонента комплемента в настоящее время используется для диагностики гуморального криза отторжения в трансплантированных почках. Однако депонирование C4d-компонента комплемента в биоптатах собственных почек не исследовалось. Целью работы было выявление C4d в биоптатах при различных заболеваниях почек.

Методы. 81 биопсия от 80 пациентов с различной патологией почки была ретроспективно исследована на наличие C4d в клубочках методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных анти-C4d-антител. (Quidel, Metro Biosystems).

Результаты. Выявлено гранулярное депонирование C4d в клубочках в 4 из 4 случаев волчаночного нефрита (два случая – класс IV, два случая – класс V) и в 3 из 3 случаев идиопатического мембранозного нефрита, возможно, соответствующее локализации депозитов иммунокомплексного типа. Линейное окрашивание гломерулярных капиллярных петель, а также мезангиальной области было отмечено в 13 случаях из 17 при фокальном сегментарном гломерулосклерозе (ФСГС), в 8 из 9 случаев IgM-нефропатии. Биоптаты в случаях липоидного нефроза были негативны в 5 из 7 случаев (в 2 позитивных случаях отложения C4d были только фокальными). В большинстве других случаев не было найдено существенного депонирования C4d в клубочках – IgA-нефропатия (5 случаев), миеломная нефропатия (2), амилоидоз (1), острый интерстициальный нефрит (3), острый канальцевый некроз (3), диабетическая нефропатия (2), системный васкулит (3), болезнь тонких базальных мембран (3).

Заключение. Депонирование C4d в клубочковых капиллярах при идиопатическом мембранозном нефрите было описано ранее, однако депонирование C4d при ФСГС является интересной находкой, что требует дальнейшего исследования. Предварительные результаты, однако, позволяют предположить, что окраска на C4d может служить дифференциальным критерием между ФСГС и липоидным нефрозом.

Background. C4d staining of peritubular capillaries is useful marker of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies. However the usefulness of C4d-findings in native kidney biopsies have not been extensively studied.

Methods. 81 biopsies from 80 patients with different pathology were stained by indirect IF method, using murine monoclonal anti-human C4d Ab (Quidel, Metro Biosystems).

Results. Granular pattern of C4d deposition in glomeruli was detected in 4 of 4 lupus cases (2-class IV and 2-class V) and in 3 of 3 cases of idiopathic membranous nephropathy on periphery of capillary loops, possibly corresponding to deposits location. Linear staining of capillary loops and mesangium in all glomeruli was detected in 13 from 17 biopsies of FSGS cases, in 8 from 9 cases of IgM-nephropathy. Biopsies with minimal change disease were negative in 5 from 7 cases (two positive cases have only focal mild deposition of C4d). Most other cases show no significant C4d deposition in glomeruli – IgA-nephropathy (5 cases), myeloma kidney (2), amyloidosis (1), AIN (3), ATN (3), toxic nephropathies (3), diabetic nephropathy (2), pauciimmune crescentic GN (3), TBMD (3).

Conclusion. C4d deposition in glomeruli in MGN was described earlier, but C4d deposition in FSGS cases is intriguing.

Адрес для переписки: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1, НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ, отделение патоморфологии

Телефон: 190-53-78. Суханов Алексей Викторович

E-mail: alexei_sukhanov@mtu-net.ru

ing findings, which need further investigation. But preliminary results suggest that C4d glomerular staining could be useful marker for differential diagnosis between FSGS and MCD.

Продукт расщепления комплемента C4d является маркером активации комплемента по классическому пути, который требует реакции антиген–антитело, представляет собой альфа-2-цепь молекулы C4-компонента комплемента. Одной из особенностей C4d является то, что после активации комплемента этот фрагмент, ковалентно соединяясь с близлежащими структурами, может сохраняться в течение длительного времени. На этой особенности основано применение антител к C4d для диагностики гуморального криза отторжения в трансплантации органов. Известно, что в биоптатах трансплантированной почки зачастую невозможно выявить антидонорские антитела методом иммунофлюоресценции или иммунопероксидазным методом, несмотря на присутствие их в сыворотке при гуморальных кризах отторжения. Возможным объяснением данного факта может быть то, что эндотелий пересаженного органа, несущий HLA-антигены донора, которые и являются мишенями при гуморальном отторжении, имеет большую поверхность, на которой трудно выявить антидонорские антитела. К тому же, вероятно, комплекс антитело–HLA-антиген очень быстро исчезает с поверхности эндотелия за счет инвагинации базальной мембраны эндотелия или слущивания комплекса в просвет капилляра. Основные компоненты комплемента также быстро исчезают с поверхности эндотелия вследствие расщепления. Поэтому демонстрация длительно присутствующего на поверхности эндотелия перитубулярных капилляров C4d-фрагмента в настоящее время широко применяется в диагностике гуморального криза отторжения (рис. 1, цв. вкл.) [1–3].

В то же время мало известно о депонировании C4d в почках при различных нефропатиях. Имеется

всего несколько работ, посвященных данной теме. Zwirner с соавт., используя иммунопероксидазный метод, продемонстрировал сегментарное и фокальное мезангиальное депонирование C4d в клубочках при различных гломерулонефритах и даже в нормальной почке [4]. Однако Kusunoki, используя непрямую иммунофлюоресцентную реакцию, не нашел отложений C4d в клубочках нормальной почечной ткани, исследуя почки, удаленные по поводу карциномы, но в то же время продемонстрировал сильное гранулярное диффузное окрашивание клубочков при идиопатическом мембранозном нефрите в 11 из 12 случаев [5]. С целью изучения возможности использования окраски на C4d в диагностике заболеваний почек мы исследовали замороженную ткань почки, полученную с помощью биопсии у пациентов с различными нефропатиями, методом непрямой иммунофлюоресценции.

Материалы и методы

81 биопсия от 80 пациентов с различной патологией почки была ретроспективно исследована на наличие C4d в клубочках методом непрямой иммунофлюоресценции. 6-микронные срезы замороженной почечной ткани фиксировались в ацетоне в течение 10 минут. После промывки срезы инкубировались с первичными антителами – мышинные моноклональные анти-C4d-антитела (Quidel, Metro Biosystems) в разведении 1:200. Су2-конъюгированные козы анти-тела к иммуноглобулину G мыши в соответствующем разведении использовались как вторичные антитела. Интенсивность окраски оценивалась полуколичественным методом от – до +++ . В некоторых случаях легкого фокального окрашивания мезангия только в одном клубочке результаты оценивались как –/±.

Таблица 1

C4d-депозиты при различных нефропатиях

Морфологический диагноз	Негативно	+/-	Позитивно	Всего
Волчаночный нефрит			4	4
Мембранозный ГН			3	3
ФСГС	4	2	11	17
IgM-нефропатия		1	8	9
Липоидный нефроз	5	2		7
Неясный диагноз (IgM? ФСГС? АН?)	1		3	4
Миеломная почка	2			2
Амлоидоз	1			1
Острый интерстициальный нефрит	3			3
Острый канальцевый некроз	3			3
Токсические нефропатии	1	1		2
IgA-нефропатия	5			5
Мезангиопролиферативный ГН (не-IgA)	1			1
Первично-васкулярная патология	2	1		3
Диабетическая нефропатия	1	1		2
Системный васкулит	3			3
Болезнь тонких базальных мембран	2	1		3
1-часовая острая трансплантационная биопсия	3	5	1	9
Всего				81

Результаты

Ни в одном случае мы не нашли окрашивания перитубулярных капилляров.

Также в большинстве случаев нефропатий мы не находили существенных депозитов C4d в клубочках (табл. 1). В случае положительных результатов отмечалось два варианта позитивной реакции:

1. Гранулярное свечение по периферии капиллярных петель клубочков во всех случаях идиопатического мембранозного нефрита (3 из 3) и волчаночного нефрита (4 из 4). Предположительно это соответствовало локализации иммунных комплексов. Так, например в 1 случае волчаночного нефрита 4-го класса, при котором электронное исследование показало как субэпителиальные, так и субэндотелиальные депозиты, окрашивание на C4d также выявило двухконтурное свечение (рис. 2, цв. вкл.). В 2 случаях волчаночного нефрита по световой и элек-

Таблица 2

C4d-депонирование при ФСГС, IgM-нефропатии и липоидном нефрозе

Морфологический диагноз	Негативно	+/-	Позитивно	Всего	% позитивных случаев
ФСГС	4	2	11	17	64,7
IgM-нефропатия	0	1	8	9	88,8
Липоидный нефроз	5	2	0	7	0

Таблица 3

C4d-депозиты у пациентов с ФСГС в различных возрастных группах

Возраст	Негативно	+/-	Позитивно
0-20	0	0	6
20-40	0	2	3
40-60	2	0	1
60-80	2	0	1

Таблица 4

C4d-депозиты у молодых пациентов (моложе 40 лет)

Диагноз	Негативно	+/-	Позитивно
ФСГС	—	2	9
IgM-нефропатия	—	1	7
Липоидный нефроз	5	—	—

Дискуссия

тронной микроскопии был диагностирован 4-й класс, в 2 – 5-й класс.

2. Мезангиальное и линейное окрашивание периферии капиллярных петель, в некоторых случаях во всех клубочках, было найдено в 11 из 17 случаев фокального сегментарного гломерулосклероза (ФСГС) и в 8 из 9 случаев IgM-нефропатии (рис. 3, цв. вкл.). Во всех этих случаях не было найдено электронно-плотных депозитов на периферии капиллярных петель методом электронной микроскопии, а также не было выявлено иммуноглобулинов и C3- и C1q-компонента комплемента методом иммунофлюоресценции, за исключением находок IgM-депозитов в мезангии клубочков при IgM-нефропатии.

У одного пациента с ФСГС было 2 биопсии с 3-месячным интервалом, обе биопсии были резко позитивны на C4d.

После первых позитивных находок окрашивания на C4d при ФСГС мы обратили особое внимание на данную патологию, а также на близкие патологии, такие, как липоидный нефроз и IgM-нефропатию.

Биопсийные критерии для включения в данные группы были следующими:

1. Для ФСГС – наличие фокального сегментарного гломерулосклероза по световой микроскопии, отсутствие иммуноглобулинов и компонентов комплемента (или только легкое мезангиальное свечение IgM) по иммунофлюоресценции, отсутствие депозитов при электронной микроскопии (ЭМ).

2. Для IgM-нефропатии – отсутствие гломерулярных изменений по световой микроскопии, умеренное/сильное свечение IgM по иммунофлюоресценции, отсутствие или присутствие электронно-плотных депозитов по ЭМ.

3. Для липоидного нефроза – отсутствие депозитов по ЭМ и иммунофлюоресценции, диффузное сглаживание малых ножек подоцитов по ЭМ.

Результаты исследования этой группы представлены в табл. 2. Ни в одном из случаев липоидного нефроза не было выявлено диффузного депонирования C4d в клубочках, за исключением 2 случаев с сегментарным отложением C4d в мезангии отдельных клубочков. Наоборот, диффузные линейные депозиты C4d в капиллярах клубочков выявлены в 8 из 9 случаев IgM-нефропатии и в 11 из 17 случаев ФСГС. Поскольку группа пациентов с ФСГС являлась гетерогенной и включала в себя как случаи первичного, так и вторичного ФСГС, была предпринята попытка выделить случаи первичного ФСГС по возрасту пациентов (пациенты с первичным, идиопатическим ФСГС представляют собой более молодой контингент). Результаты показаны в табл. 3: 9 из 11 позитивных случаев – пациенты из более молодой группы, а 4 из 4 негативных случаев имели место у пациентов преклонного возраста. Таким образом, возможно, что случаи первичного ФСГС являются C4d-позитивными, а случаи вторичного – чаще C4d-негативными. В табл. 4 сопоставлены результаты окрашивания на C4d в группах молодых пациентов (до 40 лет) с ФСГС, IgM-нефропатией и липоидным нефрозом. Ни один случай липоидного нефроза не является C4d-позитивным, и наоборот: большинство случаев ФСГС и IgM-нефропатии являются позитивными.

В данной работе мы продемонстрировали наличие депозитов C4d-компонента комплемента в клубочках в случаях волчаночного нефрита и идиопатической мембранозной нефропатии. Эти данные подтверждают предыдущие находки Kusunoko [5]. Более неожиданными оказались находки линейного депонирования C4d в клубочках в 11 из 17 случаев ФСГС и в 8 из 9 случаев IgM-нефропатии. Zwiener и соавторы, используя пероксидазный метод, обнаружили депозиты C4d в случаях ФСГС (интенсивность +/++), но не упомянули характер депонирования (предположительно – мезангиальное депонирование). Интересно, что они также нашли сегментарные гранулярные депозиты C4d в мезангиальной и капиллярной зонах во всех случаях почечных заболеваний, а также в нормальных клубочках здоровой почки. Однако в нашем исследовании был применен метод иммунофлюоресценции, используя который, мы не нашли депонирования C4d в большинстве почечных биопсий при различных нефропатиях. Также Kusunoko [5], используя иммунофлюоресцентный метод, не нашел депозитов C4d в клубочках нормальной почки. Возможным объяснением данного расхождения может быть различная чувствительность этих методов. Возможно, что иммунопероксидазный метод может быть более чувствительным по сравнению с иммунофлюоресцентным [6].

Патогенез ФСГС неизвестен, предположительно, что многие факторы определяют его развитие, такие, как генетические факторы, факторы окружающей среды и другие [7]. Возможность того, что ФСГС является иммунокомплексным заболеванием, практически не рассматривается, хотя эта теория полностью не отвергнута. Имеется много исследований, показывающих, что при ФСГС не находят иммуноглобулинов или компонентов комплемента в клубочках вообще либо находят IgM или C3 (или оба вместе) в зонах сегментарного склероза, что рассматривается как неспецифическое связывание

[6, 8]. Наши находки в достаточной степени отличны от стандартных находок, и принимая во внимание, что C4d является маркером активации комплемента по классическому пути (требующей реакции антиген–антитело), возможно, следует вновь вернуться к теории иммунокомплексной этиологии ФГС. Другим возможным объяснением наших находок может быть активация комплемента по классическому пути без наличия иммунных комплексов или через лектиновый путь активации комплемента [9].

Большинство C4d-положительных биопсий было получено от молодых пациентов, поэтому вероятно, что все эти случаи представляют собой первичный (идиопатический) ФГС. Возможно, что C4d-положительность позволит дифференцировать первичный ФГС от вторичных случаев, однако это требует дальнейшего исследования. Следует отметить, что депонирование C4d в гломерулярных капиллярах не является характерной особенностью нефротического синдрома, например все случаи липоидного нефроза с нефротическим синдромом были негативны по C4d. Поэтому возможно, что окраска на C4d может быть полезным тестом дифференциальной диагностики между данными патологиями. Мы также проверяли возможность того, что C4d-депонирование отражает лишь гиперфильтрацию. Для этой цели мы исследовали те случаи IgA-нефропатии (которая во всех случаях была отрицательной по C4d), в которых мы предполагали значительное снижение массы действующих нефронов с гиперфильтрацией в сохранившихся. Мы исследовали 2 случая IgA-нефропатии с 80 и 90% склерозированных клубочков по данным световой микроскопии. Однако проведение окраски на C4d не показало позитивного результата в сохранившихся клубочках.

Интересно, что результаты исследования на C4d в

случаях IgM-нефропатии были очень похожи на таковые при ФГС, несмотря на наличие или отсутствие депозитов по электронной микроскопии.

В заключение отметим, что линейное депонирование C4d-компонента комплемента в гломерулярных капиллярах и мезангии при ФГС и IgM-нефропатии является новой находкой. Причины возникновения данного явления в настоящее время объяснить не представляется возможным, это требует дальнейших исследований.

Литература

1. *Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G et al.* Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43: 1333–1338.
2. *Feucht HE, Lederer SR, Kluth B.* Humoral alloreactivity in recipients of renal allografts as a risk factor for the development of delayed graft function. *Transplantation* 1998 Mar 15; 65 (5): 757–758.
3. *Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Colwin RB.* Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999 Oct; 10 (10): 2208–2214.
4. *Zwirner J, Felber E, Herzog V, Rietbmuller G, Feucht HE.* Classical pathway of complement activation in normal and diseased human glomeruli. *Kidney International* 1989; 36: 1069–1077.
5. *Kusunoki Y, Itami N, Tochimaru H, Takekoshi Y, Nagasawa S, Yoshiki T.* Glomerular deposition of C4 cleavage fragment (C4d) and C4-binding protein in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Nephron* 1989; 17–19.
6. *Immunohistology in diagnostic pathology.* editor J. Charles Jennette CRC Press, Inc Boca Raton, Florida 1989; 14, 45–47.
7. *Kline W, Abdel-Rahman B, Abdel-Rahman E.* Pathogenesis of focal glomerulosclerosis. *Nephron* 2001; 88: 6–13.
8. *Gephardt GN, Tubbs RR, Popowniak KL, McMabon JT.* Focal and segmental glomerulosclerosis. Immunohistologic study of 20 renal biopsy specimens. *Arch Pathol Lab Med* 1986 Oct; 110 (10): 902–905.
9. *Lbotta K, Wurznner R, Konig P.* Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1999 Apr; 14 (4): 881–886.

Мофетила микофенолат в терапии нефротического синдрома у детей

Т.С. Вознесенская, Т.В. Сергеева

Научный центр здоровья детей РАМН, г. Москва

Mycophenolate mofetil in therapy of nephrotic syndrome in children

T.S. Voznesenskaya, T.V. Sergeeva

Ключевые слова: мофетила микофенолат, нефротический синдром, гистологические изменения, дети.

Мы провели оценку 12-месячного курса лечения мофетила микофенолатом у 6 детей со стероидзависимым и у 6 детей со стероидрезистентным нефротическим синдромом. Лечение оказалось эффективным в отношении снижения протеинурии у всех (за исключением одного) пациентов со стероидрезистентным нефротическим синдромом и в отношении уменьшения поддерживающей дозы преднизолона у всех

Адрес для переписки: 117991, г. Москва, Ломоносовский просп., д. 2/62, Научный центр здоровья детей РАМН
Телефон: 134-04-49. Вознесенская Татьяна Сергеевна