

## Диагностическое значение экспрессии коллагена IV типа в почечных клубочках при синдроме Альпорта

М.Е. Аксенова<sup>1</sup>, П.Э. Повилайтите<sup>2</sup>, Н.Е. Конькова<sup>1</sup>, В.В. Длин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Ростовское областное патологоанатомическое бюро, Ростов-на-Дону, Россия

## Diagnostic Value of Type IV Collagen Expression in Renal Glomeruli at Alport's Syndrome

M.E. Aksenova<sup>1</sup>, P.E. Povilaitite<sup>2</sup>, N.E. Konkova<sup>1</sup>, V.V. Dlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Rostov Region Pathoanatomical Bureau, Rostov-on-Don, Russia

Синдром Альпорта — наследственное мультисистемное заболевание, характеризующееся развитием прогрессирующей нефропатии. Ранняя диагностика и последующее назначение нефропротективной терапии значительно улучшает нефрологический прогноз.

Цель исследования. Определить значение иммуногистохимического метода для диагностики синдрома Альпорта.

Материал и методы. Обобщены клиничко-лабораторные и морфологические данные 35 пациентов с подозрением на синдром Альпорта (возраст 13 [11; 16] лет; 18 мальчиков и 17 девочек), обследованных в отделе нефрологии в 2013–2019 гг. Исследование почечной ткани включало световую, иммунофлуоресцентную, электронную микроскопию биоптата почки, определение экспрессии цепей  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа в почечных клубочках иммуногистохимическим методом; генетическое обследование было проведено 26 пациентам. Дети были разделены на группы в зависимости от гломерулярной экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа: норма (1-я группа,  $n=18$ ), снижена (2-я группа,  $n=4$ ), отрицательная (3-я группа,  $n=13$ ). Результаты. Нарушение экспрессии цепи  $\alpha 5$  было выявлено у  $\frac{1}{4}$  ( $q=0,78$ ) пациентов с генетически подтвержденным синдромом Альпорта и практически у всех детей с X-сцепленным вариантом заболевания ( $q=0,94$ ).

Результаты. На основе генетического анализа синдром Альпорта подтвержден у  $\frac{1}{4}$  детей 1-й группы (дети с гетерозиготными вариантами генов *COL4A3*, *COL4A5*) и у всех детей 2-й и 3-й групп (варианты *COL4A5*). Чувствительность/специфичность иммуногистохимического исследования для диагностики синдрома Альпорта составила 78%/100%, электронной микроскопии — 93%/87%. Прогностическая значимость положительного/отрицательного результата иммуногистохимического исследования составила 100%/66%, электронной микроскопии — 95%/88% по сравнению с 100%/88% при сочетанном использовании двух методов.

Заключение. Определение экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в клубочках почек имеет самостоятельное диагностическое значение, однако уступает электронной микроскопии при гетерозиготных вариантах синдрома Альпорта. Высокая специфичность иммуногистохимического метода позволяет подтвердить синдром Альпорта в случае изменения экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в клубочках почек.

**Ключевые слова:** дети, патология почек, синдром Альпорта, цепь  $\alpha 5$  коллагена IV типа, базальные мембраны клубочков почек, иммуногистохимическое исследование, иммунофлуоресценция.

**Для цитирования:** Аксенова М.Е., Повилайтите П.Э., Конькова Н.Е., Длин В.В. Диагностическое значение экспрессии коллагена IV типа в почечных клубочках при синдроме Альпорта. Рос вестн перинатол и педиатр 2020; 65(6): 42–49. DOI: 10.21508/1027–4065–2020–65–6–42–49

The Alport's syndrome is the hereditary multisystem disease characterized by the development of the progressive nephropathy. The early diagnosis and subsequent prescription of nephroprotective therapy improves significantly the nephrological prognosis.

Purpose of the Study. Determine the value of the immunohistochemical method for the Alport's syndrome diagnosis.

Material and methods. The clinical, laboratory and morphological data of 35 patients with suspected Alport's syndrome (13 years of age [11; 16]; 18 boys and 17 girls) examined in the Nephrology Department in 2013–2019 were summarized. The study of the renal tissue included the light, immunofluorescence, electron microscopy of the kidney biopsy sample, determination of the expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 5$  chains of type IV collagen in the renal glomeruli using the immunohistochemical method; the genetic testing was carried out for 26 patients. The children were divided into groups depending on the glomerular expression of  $\alpha 5$  chain of type IV collagen: normal (group 1,  $n=18$ ), decreased (group 2,  $n=4$ ), negative (group 3,  $n=13$ ). Results are as the following: The disorder of the expression of  $\alpha 5$  chain was detected in  $\frac{1}{4}$  ( $q = 0.78$ ) patients with genetically confirmed Alport's syndrome and in almost all children with the X-linked variant of the disease ( $q = 0.94$ ).

Results. Based on the genetic testing, the Alport's syndrome was confirmed in  $\frac{1}{4}$  of the children of the 1<sup>st</sup> group (the children with the heterozygous variants of *COL4A3*, *COL4A5* genes) and in all children of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups (*COL4A5* variants). The sensitivity/specificity of the immunohistochemical study for the Alport's syndrome diagnosis was 78% /100%, that of the electron microscopy — 93% /87%. The predictive value of the positive/negative result of the immunohistochemical study was 100% /66%, that of the electron microscopy — 95% / 88% compared with 100% / 88% with the combine use of two methods.

Conclusion. The determination of the expression of  $\alpha 5$  chain of type IV collagen in the renal glomeruli has the independent diagnostic value, but it is inferior to the electron microscopy in the heterozygous variants of the Alport's syndrome. The high specificity of the immunohistochemical method makes it possible to confirm the Alport's syndrome in the case of the change in the expression of  $\alpha 5$  chain of type IV collagen in the renal glomeruli.

**Key words:** children, renal pathology, Alport's syndrome,  $\alpha 5$  chain of type IV collagen, glomerular basement membranes, immunohistochemical study, immunofluorescence.

**For citation:** Aksenova M.E., Povilaitite P.E., Konkova N.E., Dlin V.V. Diagnostic value of glomerular type IV collagen expression in Alport syndrome. Ros Vestn Perinatol i Peditr 2020; 65(6): 42–49 (in Russ). DOI: 10.21508/1027–4065–2020–65–6–42–49

**С**индром Альпорта — наследственное заболевание, обусловленное мутацией генов цепей  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа, характеризующееся развитием прогрессирующей нефропатии вследствие нарушения структуры базальной мембраны клубочков почки. Ранняя диагностика заболевания и последующая нефропротективная терапия позволяют значительно улучшить нефрологический прогноз [1]. Оптимальным методом диагностики синдрома Альпорта в настоящее время является молекулярно-генетическое исследование, которое не имеет возрастных ограничений, позволяет подтвердить диагноз, прогнозировать темпы прогрессирования нефропатии в зависимости от характера мутации, а также провести каскадное обследование членов семьи и семейное медико-генетическое консультирование [2]. Отсутствие общедоступного генетического обследования пациентов с синдромом Альпорта, а также возможность наличия сочетанной патологии (включая иммунокомплексный гломерулонефрит) обуславливает сохраняющуюся актуальность диагностики путем морфологического исследования почечной ткани с включением электронной микроскопии и иммуногистохимического метода.

У пациентов с синдромом Альпорта отсутствуют специфические морфологические изменения почечной ткани по данным световой микроскопии, при микроультраструктурном исследовании базальной мембраны клубочков почки могут определяться тонкие базальные мембраны с сохранной структурой на ранних стадиях нефропатии, очаговое/диффузное утолщение и расслоение базальной мембраны на поздних стадиях заболевания [3]. Альпортоподобные изменения базальных мембран почечных клубочков в сочетании со сходным фенотипом описаны у пациентов с вариантами в генах *MUN-9* [4] и *PAX-2* [5], а также у пациентов с нефротическим синдромом, ассоциированным с мутациями генов *NPHS2* [6] и *MYOIE* [7]. Поэтому определение экспрессии цепей  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа иммуногистохимическим методом имеет дополнительное

диагностическое значение при подозрении на синдром Альпорта. Метод основан на том, что при нарушении синтеза цепей  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа, образующих гетеротримеры, как при X-сцепленном (у мужчин), так и при аутосомном варианте наследования синдрома Альпорта (обусловлены мутациями в генах *COL4A5*, *COL4A3*, *COL4A4* соответственно) интенсивность окраски цепей  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$  в базальной мембране клубочков почки будет снижена или отрицательная [8]. Женщины с X-сцепленным синдромом Альпорта часто имеют мозаичное распределение гетеротримеров коллагена IV типа в клубочках почки. Было показано также, что уровень экспрессии цепей коллагена IV типа определяет выраженность изменений базальной мембраны клубочков почки и нефрологический прогноз пациентов с синдромом Альпорта [9–11]. Несмотря на очевидное патогенетическое обоснование, значение иммуногистохимического метода для диагностики синдрома Альпорта остается неясным: существуют противоречивые данные о корреляции степени экспрессии цепей  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$  с выраженностью изменений базальной мембраны клубочков почки, а также с прогнозом у пациентов [9–11].

**Цель исследования:** установить значение уровня экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки для диагностики синдрома Альпорта и определить ее связь с выраженностью изменений базальных мембран почечных клубочков у пациентов с этим заболеванием.

#### Характеристика детей и методы исследования

В одноцентровое ретроспективное исследование были включены 35 детей с подозрением на синдром Альпорта, обследованные в отделении наследственных и приобретенных болезней почек имени проф. М.С. Игнатовой НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева в период с 2013 по 2019 г.

Клинико-лабораторное обследование пациентов включало уточнение семейного анамнеза, выявление нейросенсорной тугоухости, артериальной гипертензии по уровню разового и амбулаторного измерения артериального давления (критерий артериальной гипертензии: уровень систолического и/или диастолического артериального давления  $\geq 95\%$  нормального распределения в зависимости от пола, возраста и роста ребенка), протеинурии/протеинурии нефротического уровня (белок мочи  $>100/960$  мг/м<sup>2</sup>/сут) и определение расчетной скорости клубочковой фильтрации по Шварцу (рСКФ, мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>) [12]. Всем детям при наличии информированного согласия законного представителя проводилось морфологическое исследование почечной ткани, включая электронную микроскопию и иммуногистохимический анализ экспрессии цепей  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа.

Исследование нефробиоптата осуществлялось следующими методами: световая (окраски гемато-

© Коллектив авторов, 2020

**Адрес для корреспонденции:** Аксенова Марина Евгеньевна — к.м.н., вед. науч. сотр. отдела наследственных и приобретенных болезней почек, врач-нефролог консультативно-диагностического отделения Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-3699-1884 e-mail: maksyonova@pedklin.ru

Конькова Наталья Евгеньевна — к.м.н., зав. отделением нефрологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0003-3182-5892

Длин Владимир Викторович — д.м.н., и.о. дир., рук. отдела наследственных и приобретенных болезней почек им. профессора М.С. Игнатовой Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-3050-7748 125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

Повилайте Патриция Эдмундовна — д.м.н., дир. Ростовского областного патологоанатомического бюро, ORCID: 0000-0002-0934-0349 344015 Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, д. 170 А

ксилином и эозином, ШИК-реакция, трихром по Масону) и иммунофлюоресцентная (с применением антисывороток против IgG, IgM, IgA и комплемента) микроскопия (проводились в патолого-анатомическом отделении ГКБ № 52 Москвы), электронномикроскопическое и иммуногистохимическое исследования почечной ткани (Ростовское областное патологоанатомическое бюро, Ростов-на-Дону). Для световой микроскопии фиксация нефро-биоптата в растворе нейтрального 10% формалина на фосфатном буфере осуществлялась на месте его получения, в последующем ткань почки фиксировали в парафине. Для иммунофлюоресцентного анализа были использованы криостатные срезы почечной ткани, обработанные прямым и непрямым методом Кунса с применением антисывороток. Для электронной микроскопии ткань почки фиксировали в 2,4% растворе глутарового альдегида с дофиксацией в 1% растворе тетраоксида осмия, обезвоживали и заключали в эпон. Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме 1KB-111, контрастировали уранилацетатом и солями свинца и исследовали в электронном микроскопе УЕМ-100В («ЛОМО», Россия). Толщина базальной мембраны клубочков почки определяли исходя из среднего значения из 30 измерений; критерием тонких базальных мембран служила толщина базальной мембраны менее 200 нм [13]. Среднее количество клубочков почки для ультраструктурного анализа составило 2 (от 1 до 5). Были выделены 3 типа изменений базальной мембраны клубочков почки по данным электронной микроскопии (рис. 1): нормальная толщина/структура, изменение толщины (тонкая или с участками утолщения базальная мембрана клубочков почки) с сохраненной структурой, диффузно утолщенная с нарушением структуры.

Качественное определение уровня экспрессии цепей  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа в клубочках и канальцах почек проводили методом иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител; экспрессия цепи  $\alpha 1$  служила внутренним контролем и была нормальной у всех пациентов;

в качестве внешнего контроля использовали нефро-биоптаты пациентов с негломерулярными болезнями почек. В зависимости от уровня и характера распределения цепей  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки были выделены варианты экспрессии (рис. 2): 1-й — нормальная (соответствующая контролю), 2-й — очаговая (сниженная) и 3-й — отрицательная экспрессия цепей коллагена.

Молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования нового поколения (NGS) было проведено у 16 пациентов (к.б.н. Л.И. Шагам, научно-исследовательская лаборатория общей патологии НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева). В 7 случаях использовалась таргетная панель генов *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, включающая секвенирование экзонов и смежных 5-нуклеотидных участков интронов генов с суммарным размером праймеров 16 615 п.н., суммарным покрытием 96%, средним покрытием целевых фрагментов более 350х. У 3 детей было проведено клиническое секвенирование экзона: анализ ДНК методом парно-концевого прочтения ( $2 \times 151$  п.о.), среднее покрытие не менее 70–100х. Данные секвенирования анализировали с использованием автоматического алгоритма, с применением методов прогнозирования патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster, LRP) и расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PlastCons); выявленный генотип подтверждался методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

Экспрессия цепей  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$  коллагена IV типа в большинстве случаев (частота,  $q=0,89$ ) была одинаковой, отличия касались 4 девочек:  $\alpha 3$  норма/ $\alpha 5$  снижена ( $n=2$ ),  $\alpha 3$  снижена/ $\alpha 5$  негативна ( $n=2$ ); среди пациентов с генетически подтвержденным синдромом Альпорта уровень экспрессии цепей  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$  полностью совпадал. Поэтому группы пациентов были сформированы с учетом характера свечения цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки: 1-я группа ( $n=18$ ) — пациенты с нормальной (соответствующей контролю), 2-я группа ( $n=4$ ) — дети с очаговой

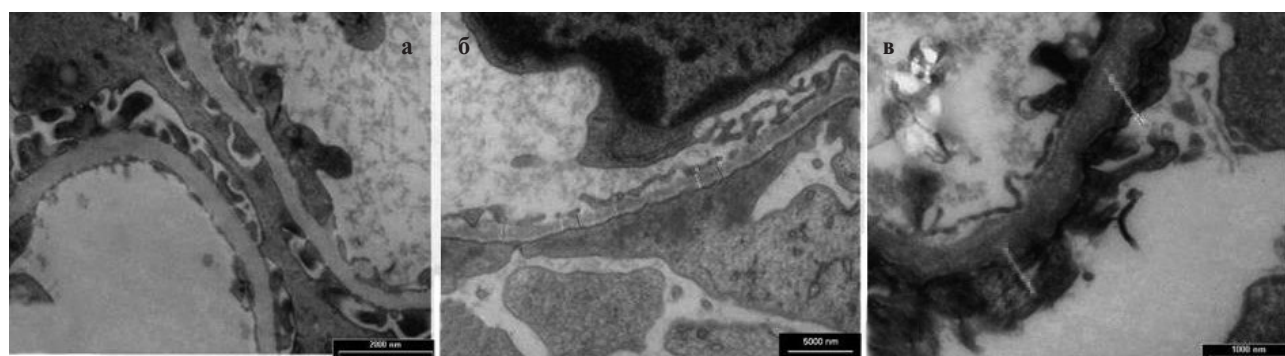


Рис. 1. Электронная микроскопия клубочков почек, вид базальной мембраны клубочков: норма (а), тонкая с сохраненной структурой (б), диффузное утолщение, расслоение (в).

Fig. 1. Electron microscopy appearance of glomerular basement membrane: normal (a), thin with normal structure (b), thickening splitting (v).

(сниженной) и 3-я группа ( $n=13$ ) — пациенты с отрицательной экспрессией цепи  $\alpha 5$ .

Для статистической обработки полученных данных использовали методы параметрического и непараметрического анализа в зависимости от характера распределения признаков, определяемого по критерию Колмогорова—Смирнова. Количественные показатели при нормальном распределении представлены как средние значения и стандартная ошибка среднего значения ( $M \pm m$ ), при распределении, отличном от нормального, — как медиана и квартильный размах ( $Me$  [Q1; Q3]); качественные показатели выражены в абсолютных значениях ( $n$ ) и долях ( $q$ ). Для сравнения групп в зависимости от характера распределения применяли парный критерий Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона. С целью выявления зависимости признаков рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) и коэффициент детерминации ( $r^2$ ). С целью сравнения групп по распространенности исхода вычислялось отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом. Для определения диагностической значимости метода диагностики вычисляли его чувствительность ( $Se$ ), специфичность ( $Sp$ ), прогностическую ценность положительного (PPV) и отрицательного (NPV) результатов. За критический уровень достоверности различий был принят  $p < 0,05$ .

## Результаты

Все пациенты ( $n=35$ , возраст 13 [11; 16] лет; 18 мальчиков и 17 девочек), включенные в исследование, имели торпидную гематурию разной степени выраженности, которая сочеталась с минимальной протеинурией у 8 детей ( $q=0,23$ ), с протеинурией субнефротического уровня у 2 ( $q=0,06$ ), сопровождала нефротический синдром/протеинурию нефротического уровня у 7 пациентов ( $q=0,2$ ). В половине случаев гематурия имела семейный характер ( $q=0,52$ ).

Группы с разным уровнем экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа не различались между собой по возрасту и полу; нейросенсорная тугоухость чаще диагностировали у детей 3-й группы, артериальную гипертензию и снижение рСКФ — у пациентов 1-й и 3-й групп (табл. 1).

На основе результатов морфологического обследования у пациентов 1-й группы были диагностированы IgA-нефропатия ( $n=8$ ), включая 1 пациента с гетерозиготным вариантом в гене *COL4A3*, и фокально-сегментарный гломерулосклероз ( $n=5$ ) (табл. 2). В первом случае основным клиническим проявлением заболевания была гематурия в сочетании с протеинурией, во втором — стероидорезистентный нефротический синдром ( $n=3$ ), протеинурия нефротического и субнефротического уровня ( $n=2$ ). Большинство пациентов 1-й группы имели сохранную базальную мембрану клубочков почки, при этом ни у одного из генетически обследованных детей с сохранной базальной мембраной, включая 2 детей с семейной гематурией, не было выявлено вариантов в генах коллагена IV типа (табл. 3). В то же время 3 из 5 детей этой группы с истончением/утолщением базальной мембраны клубочков почки по данным электронной микроскопии имели патогенные варианты в гене *COL4A3*; у 2 пациентов с нарушением структуры базальной мембраны были выявлены патогенные мутации генов *COL4A5* и *NPHS2*.

У всех детей 2-й группы отмечались изменения базальной мембраны клубочков почки разной степени выраженности. Все пациенты 3-й группы в отсутствие экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа имели типичные для синдрома Альпорта утолщение и расслоение базальной мембраны клубочков почки. Генетическое обследование 14 детей во 2-й и 3-й группах выявило патогенные варианты в гене *COL4A5*.

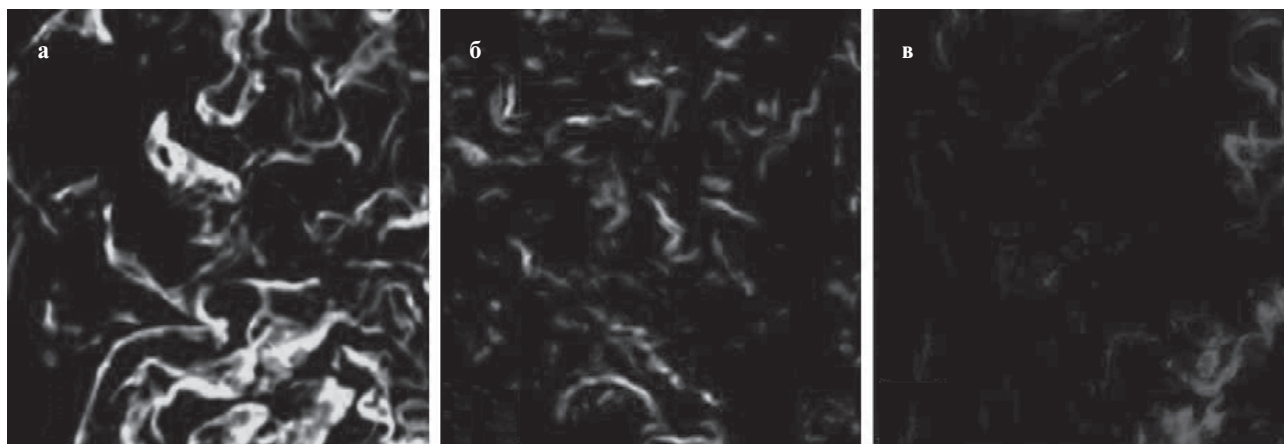


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование базальной мембраны клубочков почек, окраска цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа: норма (а), снижена, очаговая (б), отрицательная (в).

Fig. 2. Immunohistochemistry of glomerular basement membrane, staining for  $\alpha 5$  chain of type IV collagen: normal (a), segmental/decreased (б), negative (в).

Таким образом, в большинстве случаев у пациентов с генетически-подтвержденным синдромом Альпорта ( $n=14$ ,  $q=0,78$ ) было выявлено нарушение экспрессии  $\alpha 5$  цепи коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки. Уровень экспрессии, соответствующий контролю, отмечался у детей

с гетерозиготными вариантами генов *COL4A3* и *COL4A5*, включая 1 пациента с наслоением IgA-нефропатии. В случае X-сцепленного наследования иммуногистохимический метод позволял диагностировать заболевание у большинства девочек ( $n=7$ ,  $q=0,88$ ) и у всех мальчиков. У всех пациентов с дру-

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика групп на момент проведения биопсии почки

Table 1. Clinical-laboratory data of groups at the moment of renal biopsy

Клинико-лабораторные признаки	1-я группа ( $n=18$ )	2-я группа ( $n=4$ )	3-я группа ( $n=13$ )	$p$
Возраст, годы ( $M \pm m$ )	12,2 $\pm$ 5,1	11,5 $\pm$ 1,9	13,1 $\pm$ 2,2	
Мальчики, $q$	0,44	0,25	0,61	
Типичный для синдрома Альпорта семейный анамнез, $q$	0,39	1	0,54	$p_{1-2}=0,032$ $p_{2-3}=0,045$
Нейросенсорная тугоухость, $q$	0,06	0	0,31	$p_{2-3}=0,048$
Артериальная гипертензия, $q$	0,28	0	0,31	$p_{1-2}=0,045$ $p_{2-3}=0,048$
Протеинурия/нефротического уровня, $q$	0,56/0,28	0,25/0,25	0,46/0,23	
Протеинурия, мг/м <sup>2</sup> /сут Me [Q1; Q3]	119 [18; 732]	40 [28; 233]	87 [19; 431]	
рСКФ <90 мл/1,73 м <sup>2</sup> /мин, $q$	0,22	0	0,38	$p_{1-2}=0,048$ $p_{2-3}=0,039$
рСКФ, мл/1,73 м <sup>2</sup> /мин ( $M \pm m$ )	103 $\pm$ 15	102 $\pm$ 3	102 $\pm$ 22	

Примечание. рСКФ — расчетная скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 2. Морфологическая характеристика групп пациентов

Table 2. Results of morphological study of patients in different groups

Морфологические изменения	1-я группа ( $n=18$ )	2-я группа ( $n=4$ )	3-я группа ( $n=13$ )	$p$
IgA-свечение положительное, $q$	0,44	0	0	$p_{1-3}=0,032$
Фокальный глобальный/сегментарный гломерулосклероз, $q$	0,39	0,25	0,54	
Базальные мембраны клубочков*: не изменены, $q$	0,61	0	0	$p_{1-2}=0,038$ $p_{1-3}=0,035$
тонкие/очагово утолщены, структура сохранна, $q$	0,28	0,25	0	$p_{1-3}=0,048$
утолщены, структура нарушена, $q$	0,11	0,75	1	$p_{1-2}=0,047$ $p_{1-3}=0,002$

Примечание. \* — по данным электронной микроскопии.

Таблица 3. Диагноз пациентов с учетом результатов генетического обследования

Table 3. Diagnosis of patients considering genetic testing results

Базальная мембрана клубочков почки	Экспрессия цепи $\alpha 5$ коллагена IV типа		
	норма ( $n=12$ )	снижена ( $n=4$ )	отсутствует ( $n=10$ )
Нормальная ( $n=7$ )	IgA-нефропатия, 3 м/1 д ФСГС, 3 м		
Тонкая/утолщена, структура не изменена ( $n=4$ )	IgA-нефропатия + АД-СА: <i>COL4A3</i> , миссенс, 1 м; АД-СА: <i>COL4A3</i> , миссенс, 2 д X-CA: <i>COL4A5</i> , миссенс, 1 д		
Утолщена, расслоена ( $n=15$ )	X-CA: <i>COL4A5</i> , миссенс, 1 д; ФСГС, <i>NPHS2</i> +, 1 д	X-CA: <i>COL4A5</i> , сдвиг рамки считывания, 1 м; <i>COL4A5</i> , миссенс, 2 д	X-CA: <i>COL4A5</i> , делеция, 1 м; <i>COL4A5</i> , миссенс, 6 м/3 д

Примечание. ФСГС — фокально-сегментарный гломерулосклероз; X-CA — X-сцепленный синдром Альпорта; АД-СА — аутодоминантный синдром Альпорта; м — мальчики; д — девочки.

гой патологией клубочков почки отмечалась сохранная экспрессия цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки.

Патология базальной мембраны клубочков почки у детей с синдромом Альпорта проявлялась в виде изменения ее толщины — у пациентов с гетерозиготными мутациями генов *COL4A3* и *COL4A5* ( $n=4$ ,  $q=0,22$ ) или типичных ультраструктурных изменений, выявляемых с одинаковой частотой у девочек и мальчиков ( $q=0,86$  по сравнению с  $q=1$ ). Выраженность изменений базальной мембраны клубочков почки была связана с уровнем экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа ( $r=-0,79$ ,  $p=0,001$ ;  $r^2=0,503$ ).

Выявление нарушения экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в клубочках почки значительно увеличивало шансы наличия синдрома Альпорта у детей: ОШ  $28 \pm 1,2$  (95% доверительный интервал — ДИ 2,65–295;  $p<0,05$ ), в то время как ее нормальный уровень экспрессии в базальной мембране клубочков почки уменьшал вероятность синдрома Альпорта в 10 раз: ОШ  $10,66 \pm 0,66$  (95% ДИ 1,53–74;  $p<0,05$ ). Однако наличие типичных изменений базальной мембраны по данным электронной микроскопии имело более высокое диагностическое значение: ОШ  $126 \pm 1,48$  (95% ДИ 6,89–230;  $p<0,05$ ). Кроме того, отсутствие изменений толщины и структуры базальной мембраны клубочков почки снижало вероятность наличия синдрома Альпорта в 100 раз: ОШ  $105 \pm 1,48$  (95% ДИ 5,7–1934;  $p<0,05$ ). Несмотря на более низкую, чем у электронной микроскопии (ЭМ), чувствительность ( $Se$ ), иммуногистохимический метод (ИГХ) обладает высокой специфичностью ( $Sp$ ) для диагностики синдрома Альпорта:  $Se_{ИГХ} = 78\%$  по сравнению с  $Se_{ЭМ} = 93\%$ ,  $Sp_{ИГХ} = 100\%$  по сравнению с  $Sp_{ЭМ} = 87\%$ . В нашем случае сочетанное использование электронной микроскопии и иммуногистохимического метода не повышало чувствительность диагностики ( $Se_{ИГХ+ЭМ} = 93\%$ ). Прогностическая значимость положительного результата электронной микроскопии была выше, чем у иммуногистохимического метода ( $PPV_{ЭМ} = 95\%$  по сравнению с  $PPV_{ИГХ} = 100\%$ ), но прогностическая значимость отрицательного результата была значительно ниже ( $NPV_{ЭМ} = 88\%$  по сравнению с  $NPV_{ИГХ} = 66\%$ ). Сочетанное применение методов повышает прогностическую значимость их положительного/отрицательного результата ( $PPV_{ИГХ+ЭМ} = 100\%$ ,  $NPV_{ИГХ+ЭМ} = 88\%$ ) для диагностики заболевания.

Таким образом, выраженность изменений базальной мембраны клубочков почки зависит от уровня экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в этих клубочках. Определение уровня экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа обладает более низкой чувствительностью, но высокой специфичностью для диагностики синдрома Альпорта по сравнению с электронной микроскопией клубочков почки. Сочетанное исполь-

зование иммуногистохимического метода и электронной микроскопии повышает качество диагностики синдрома Альпорта.

## Обсуждение

Для определения роли иммуногистохимического метода в диагностике синдрома Альпорта в настоящее исследование были включены пациенты с подозрением на синдром Альпорта, у большинства из которых ( $n=26$ ,  $q=0,74$ ) имелись результаты генетического обследования. Сохранная экспрессия цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки была выявлена у всех пациентов, не имевших варианты в генах *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, включая ребенка с патогенным вариантом *NPHS2* и типичными для синдрома Альпорта изменениями базальной мембраны. Согласно полученным данным альпортподобные изменения базальной мембраны клубочков почки могут иметь пациенты с патогенными вариантами в гене подоцина. В то же время нормальная экспрессия цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа ожидаема у 30% пациентов с синдромом Альпорта даже при наличии изменений в базальной мембране клубочков почки и гетерозиготных вариантов в генах *COL4A3* и *COL4A5* [9, 12]. Это обуславливает ограничение диагностического значения иммуногистохимического метода при синдроме Альпорта. Повысить качество диагностики позволяет электронная микроскопия, при использовании которой отсутствие изменений базальной мембраны клубочков почки выявляется только у 12% пациентов с синдромом Альпорта.

Нарушение экспрессии цепи  $\alpha 5$  имелось более чем у  $\frac{3}{4}$  ( $n=14$ ,  $q=0,79$ ) пациентов с генетически подтвержденным синдромом Альпорта и практически у всех детей с X-сцепленным вариантом заболевания ( $n=14$ ,  $q=0,93$ ). Это согласуется с данными литературы: изменение экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки определяется у 60–90% детей с X-сцепленным синдромом Альпорта [9–11, 14].

Нарушение экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена в базальной мембране клубочков почки обнаружено у всех мальчиков с патогенными вариантами в гене *COL4A5*, в том числе с миссенс-мутациями. Неожиданным было выявление сниженной экспрессии цепи  $\alpha 5$ , а не ее полное отсутствие у мальчика с мутацией сдвига рамки считывания и полное отсутствие цепи  $\alpha 5$  у девочек с миссенс-мутациями. Согласно данным литературы корреляция между характером мутаций *COL4A5* и степенью синтеза цепей коллагена неполная: в редких случаях truncation-мутаций, определяющих преждевременное прекращение синтеза белка, может выявляться цепь  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки, тогда как при миссенс-мутациях цепь  $\alpha 5$  клубочков почки иногда полностью отсутствует [9, 11, 15, 16]. В первом случае это может быть

связано с выпадением экзона, кратного триплету нуклеотидных оснований или соматическим мозаицизмом [16–18], во втором – с нарушением синтеза/выхода гетеротримера коллагена IV типа из подоцитов [19]. У девочек синтез цепи  $\alpha 5$  коллагена имеет мозаичный характер, определяемый случайной лайонизацией одной из X-хромосом [20]. У обследованных нами пациенток могла наблюдаться неслучайная X-инактивация, при которой в большинстве клеток активна хромосома X, несущая патогенный вариант в гене *COL4A5*, или в материал для исследования могли попасть клубочки почки с нарушенным синтезом коллагена.

Интересной находкой стало наличие сочетания IgA-нефропатии и синдрома Альпорта у одного ребенка. Вероятно, сочетанная патология не редкость: исследование группы из Колумбийского университета показало, что в 9 из 46 семей с IgA-нефропатией была выявлена сегрегация патогенных и возможно патогенных вариантов генов *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* [21].

На результаты нашего исследования могли повлиять как малочисленность выборки больных, так и критерии отбора детей для проведения биопсии почки, что обусловило отсутствие/малое количество пациентов с ранними стадиями заболевания, при которых иммуногистохимическое исследование может иметь большее значение для диагностики син-

дрома Альпорта: медиана возраста в когорте обследованных нами пациентов составила 13 лет, признаки прогрессирования нефропатии в виде протеинурии, снижения рСКФ имелись у более 50% пациентов ( $q=0,61$ ), изменения базальной мембраны клубочков почки разной степени выраженности отмечались у всех детей. Кроме того, иммуногистохимический метод может иметь значение в случаях синдрома Альпорта, ассоциированного с мутациями *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, не выявляемыми при таргетном/экзомном секвенировании (например, крупные делеции): в нашей выборке не было пациентов с нарушением экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в базальной мембране клубочков почки при отрицательном результате генетического обследования.

### Заключение

Таким образом, показано, что степень изменения базальной мембраны клубочков почки зависит от уровня экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в клубочках почки. Определение экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в клубочках почки имеет самостоятельное диагностическое значение, однако уступает данным электронной микроскопии при гетерозиготных вариантах синдрома Альпорта. В случае нарушения экспрессии цепи  $\alpha 5$  коллагена IV типа в клубочках почки иммуногистохимический метод позволяет подтвердить синдром Альпорта.

### ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Gross O., Licht C., Anders H., Hoppe B., Beck B., Tönshoff B. et al. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney Int* 2012; 81(5): 494–501. DOI: 10.1038/ki.2011.407
- Savigne J., Ariani F., Mari F., Bruttini M., Renieri A., Gross O. et al. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2019; 34(7): 1175–1189. DOI: 10.1007/s00467-018-3985-4
- Crosgove D., Liu S. Collagen IV diseases: a focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol* 2017; 57–58: 45–54. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.005
- Tabibzadeh N., Fleury D., Labatut D., Bridoux F., Lionet A., Jourde-Chiche N. et al. MYH9-related disorders display heterogeneous kidney involvement and outcome. *Clin Kidney J* 2018; 12(4): 494–502. DOI: 10.1093/ckj/sfy117
- Ohtsubo H., Morisada N., Kaito H., Nagatani K., Nakanishi K., Iijima K. Alport-like glomerular basement membrane changes with renal-coloboma syndrome. *Pediatr Nephrol* 2012; 27(7): 1189–1192. DOI: 10.1007/s00467-012-2125-9
- Kitamura A., Tsukaguchi H., Maruyama K., Shono A., Iijima K., Kagami S., Doi T. Steroid resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2008; 74(9): 1209–1215. DOI: 10.1038/ki.2008.297
- Mele C., Iatropoulos P., Donadelli R., Calabria A., Maranta R., Cassis P. et al.; PodoNet Consortium. MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 365(4): 295–306. DOI: 10.1056/NEJ-Moa1101273
- Nakanishi K., Yoshikawa N., Iijima K., Kitagawa K., Nakamura H., Ito H. et al. Immunohistochemical study of alpha 1–5 chains of type IV collagen in hereditary nephritis. *Kidney Int* 1994; 46(5): 1413–1421. DOI: 10.1038/ki.1994.413
- Barsotti P., Muda A.O., Mazzucco G., Massella L., Basolo B., De Marchi M. et al. Distribution of alpha-chains of type IV collagen in glomerular basement membranes with ultrastructural alterations suggestive of Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(5): 945–952. DOI: 10.1093/ndt/16.5.945
- Hashimura Y., Nozu K., Kaito H., Nakanishi K., Fu X.J., Ohtsubo H. et al. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV  $\alpha 5$  chain. *Kidney Int* 2014; 85(5): 1208–1213. DOI: 10.1038/ki.2013.479
- Massella L., Gangemi C., Giannakakis K., Crisafi A., Faragiana T., Fallerini C. et al. Prognostic value of glomerular collagen IV immunofluorescence studies in male patients with X-linked Alport syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8(5): 749–755. DOI: 10.2215/CJN.07510712
- KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 2013; 3(Suppl): 1–150.
- Vogler C., McAdams A.J., Homan S.M. Glomerular basement membrane and lamina densa in infants and children: an ultrastructural evaluation. *Pediatr Pathol* 1987; 7: 527–534.
- Said S.M., Fidler M.E., Valeri A.M., McCann B., Fiedler W. et al. Negative Staining for COL4A5 Correlates With Worse Prognosis and More Severe Ultrastructural Alterations in Males With Alport Syndrome. *Kidney Int Rep* 2016; 2(1): 44–52. DOI: 10.1016/j.ekir.2016.09.056

15. Naito I., Kawai S., Nomura S., Sado Y., Osawa G. Relationship between COL4A5 gene mutation and distribution of type IV collagen in male X-linked Alport syndrome. Japanese Alport Network. *Kidney Int* 1996; 50(1): 304–11. DOI: 10.1038/ki.1996.316
16. Horinouchi T., Nozu K., Yamamura T., Minamikawa S., Omori T., Nakanishi K. et al. Detection of Splicing Abnormalities and Genotype-Phenotype Correlation in X-linked Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29(8): 2244–2254. DOI: 10.1681/ASN.2018030228
17. Gao E., Yang X., Si N., Liu K., Wang J.Q., Liu Z. A Novel COL4A5 Splicing Mutation Causes Skipping of Exon 14 in a Chinese Family with Alport Syndrome. *Kidney Dis* 2020; 6(1): 43–49. DOI: 10.1159/000502798
18. Bu L., Chen J., Nelson A.C., Katz A., Kashtan C.E., Kim Y., Pierpont M.E. Somatic Mosaicism in a Male Patient With X-linked Alport Syndrome. *Kidney Int Rep* 2019; 4(7): 1031–1035. DOI: 10.1016/j.ekir.2019.03.005
19. Kamura M., Yamamura T., Omachi K., Suico M.A., Nozu K., Kaseda S. et al. Trimerization and Genotype-Phenotype Correlation of COL4A5 Mutants in Alport Syndrome. *Kidney Int Rep* 2020; 5(5): 718–726. DOI: 10.1016/j.ekir.2020.01.008
20. Kashtan C.E. Alport syndrome and the X chromosome: implications of a diagnosis of Alport syndrome in females. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(6): 1499–1505. DOI: 10.1093/ndt/gfm024
21. Li Y., Groopman E.E., D'Agati V., Prakash S., Zhang J., Mizerska-Wasiak M. et al. Type IV Collagen Mutations in Familial IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep* 2020; 5(7): 1075–1078. DOI: 10.1016/j.ekir.2020.04.011.

Поступила: 15.08.20

Received on: 2020.08.15

*Конфликт интересов:*

*Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.*

*Conflict of interest:*

*The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.*