

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**МЕТОД ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОГО НЕФРИТА  
(СИНДРОМА АЛЬПОРТА)**

Инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»;  
УЗ «2-я Городская детская клиническая больница» г. Минска;  
Национальная академия наук Беларуси

**АВТОРЫ:**

канд. мед. наук В. В. Савош; канд. мед. наук, доц. Т. А. Летковская; д-р  
мед. наук, проф. Е. Д. Черствый; И. В. Сахаров; чл.-кор. НАН Беларуси, д-р  
мед. наук, проф. А. В. Сукало; Н. И. Тур; канд. мед. наук И. А. Козыро;  
канд. мед. наук А. В. Крылова-Олефиренко

Подписано в печать 25.03.13. Формат 60x84/16. Бумага писчая «Снегурочка».  
Ризография Гарнитура «Times». Усл. печ. л.  
0,46. Уч.-изд. л. 0,35. Тираж 30 экз. Заказ 169.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение  
образования «Белорусский государственный медицинский университет».  
ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.

Минск 2013

Инструкция по применению разработана с целью улучшения диагностики наследственного нефрита (синдрома Альпорта) с использованием клинических и морфологических методов, содержит рекомендации по **выполнению** иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследований.

Инструкция предназначена для врачей-нефрологов и врачей-патологоанатомов. Области применения: нефрология, патологическая анатомия. Уровень внедрения: нефрологические отделения городских, областных больниц, диагностические центры, областные и городские патологоанатомические бюро.

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Клинико-лабораторная и морфологическая диагностика наследственного нефрита — синдрома Альпорта (СА).

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению отсутствуют.

## ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

1. Микроскоп.
2. Микротом.
3. Нагреваемая барокамера Pascal или микроволновая печь.
4. Тканевой процессор.
5. Заливочный центр.
6. Лабораторная посуда.
7. Холодильник.
8. Ультратом.
9. Электронный микроскоп
- 10. Вытяжной шкаф.**
11. Таймер.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

### I. Клинический пап диагностики

Первые симптомы заболевания в виде изолированного мочевого синдрома чаще выявляются у детей первых трех лет жизни. В большинстве случаев заболевание обнаруживается случайно. Одним из основных признаков является гематурия различной степени выраженности, наблюдаемая в 100 % случаев. Усиление выраженности гематурии отмечается во

- неравномерное изменение толщины базальной мембраны (чередование утолщенных и истонченных участков в пределах одной капиллярной петли клубочка);
- отложение множественных мелких (20-90 им) электронно-плотных внутримембранных депозитов с очаговым утолщением базальной мембраны;
- расщепление базальной мембраны в участках утолщения;
- неровность внешнего контура базальной мембраны в участках утолщения;
- иногда наблюдаются разрывы базальной мембраны в участках истончения.

Ультраструктурные изменения более выражены и распространены у мальчиков при X-сцепленном типе наследования заболевания. У девочек участки истончения и расслоения чаще фокальные и чередуются с неизменными участками. У некоторых гетерозиготных девочек с X-сцепленным типом наследования заболевания наблюдается распространенное истончение базальных мембран с небольшими и непостоянными участками расслоения.

## ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано.

Ошибки могут отмечаться как на этапе клинической, так и морфологической диагностики. На первом этапе к диагностическим ошибкам могут приводить: недооценка анамнеза пациента, нетипичность жалоб, изменение клинической картины под влиянием ранее назначенного лечения. При проведении иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследования ошибки могут быть обусловлены следующим:

- использование реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся;
- неправильное разведение реактивов, несоблюдение временного и температурного режима при выполнении методики.

Во избежание подобных ошибок необходимо при проведении иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследования строго соблюдать все методические требования.

мента не имеет оольшого значения, поскольку иммунные депозиты в клубочках и строме почки при наследственном нефрите обычно отсутствуют.

Обнаружение в строме пенистых клеток на фоне отсутствия у обследуемого ребенка выраженной протеинурии может служить лишь косвенным признаком наследственного нефрита и в сочетании с клинико-анамнестическими данными позволяет выделить случаи с высокой вероятностью СА для проведения дальнейшего ИГХ исследования с антителами к субъединицам коллагена IV типа.

## 2. Иммуногистохимическое исследование

Гистологические срезы толщиной 4 мкм депарафинируют, регидратируют, после чего производят блокирование эндогенной пероксидазы путем обработки срезов 3 % раствором перекиси водорода в течение 20 мин. После этого срезы обрабатывают в нагреваемой барокамере Pascal или аналогичной в цитратном буфере (pH 6,0) при температуре 125 °C и давлении 25 psi в течение 2,5 минут. Вместо барокамеры можно использовать микроволновую печь при мощности 700-800 В, однако в этом случае время обработки существенно увеличивается (16 минут) и ухудшается качество препарата. **Неспецифическое** связывание антитела блокируют 1 % бычьим сывороточным альбумином в трис-буфере (pH 7,6) в течение 30 мин, после чего наносят первичные антитела в соответствующих разведениях (табл. 1). Обязательные требования при выборе первичного антитела: указание в спецификации производителя на возможность использования в диагностических целях (маркировка «for in vitro diagnostic use») на формалин-фиксированном материале (маркировка «for formalin-fixed tissues»). Инкубацию с первичным антителом производят в течение 18 ча-

Название антитела	Разведение антитела
Анти-COLA3	1:200
Анти-COLA5	1:2000

сов в холодильнике при +4 °C.

Таблица 1

### Рекомендуемые разведения для первичных антител

Препарат интенсивно промывают в трис-буфере. Затем **осуществляют** визуализацию результата реакции при помощи полимерной системы и диаминобензидина (ДАБ) в соответствии с рекомендациями производителя. Длительность инкубации в ДАБ устанавливают в каждой лаборатории индивидуально, для чего необходимо наблюдать процесс появления коричневого окрашивания под микроскопом. Время окрашивания считается достаточным, если структуры подлежащие окрашиванию, приобрели ярко-золотисто-коричневый цвет при отсутствии фонового окрашивания. Срезы контрокрашивают гематоксилином Майера (время зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лабо-

ратории индивидуально) и заключают в канадский бальзам или аналогичную среду.

Для контроля активности первичных антител в каждой серии необходимо проведение одного отрицательного и одного положительного контрольного окрашивания. Для отрицательного контрольного окрашивания срезы вместо инкубации с первичным антителом покрывают 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве положительного контроля для обоих антител следует использовать ткань здоровой почки. В исследуемом материале окраска расценивается как положительная только при отсутствии окрашивания в отрицательном контрольном препарате и, наоборот, как отрицательная при наличии окрашивания в положительном контрольном препарате.

### Интерпретация результатов иммуногистохимического окрашивания с антителами к α3 и α5 субъединицам коллагена IV типа

Положительная ИГХ реакция выявления субъединиц коллагена IV типа в нормальной почечной ткани определяется в виде четкого линейного окрашивания базальных мембран капилляров почечного клубочка с антителами к α3 и α5 **субъединицам**, а также капсулы Шумлянско-Боумена при использовании антител к α5 субъединице коллагена IV типа (рис. 1).

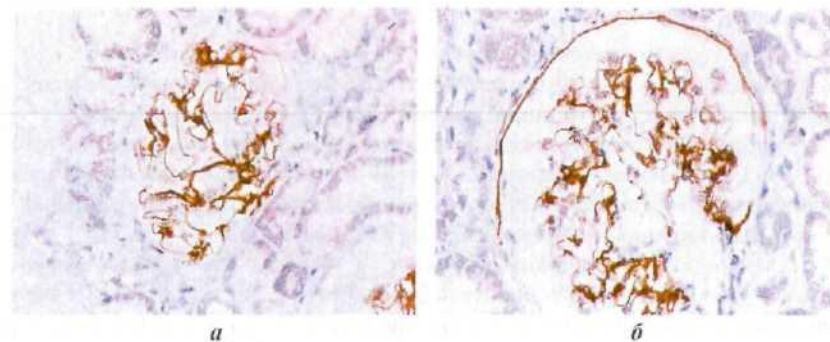


Рис. 1. ИГХ окрашивание с антителами к α3 (а) и α5 (б) субъединицам коллагена IV типа, линейное **окрашивание базальных** мембран капилляров клубочка и капсулы Шумлянско-Боумена, **хромоген диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера**, увеличение \*400

Для различных вариантов синдрома Альпорта (аутосомно-рецессивного, X-сцепленного) характерны разные паттерны экспрессии субъединиц коллагена IV типа (табл. 2).

Как видно из табл. 2, отрицательный результат ИГХ окрашивания с антителами к α3 и α5 субъединицам коллагена IV типа (α3«-»α5«->> пат-

терн экспрессии) характерен для X-сцепленного синдрома Альпорта у мальчиков, тогда как у девочек X-сцепленный СА характеризуется мозаичной экспрессией обеих субъединиц коллагена IV типа во всех структу-

	a3	a5
Норма		
Базальная мембрана капилляров клубочка	+	+
Базальные мембраны канальцев, капсулы Шумлянского-Боумена	+	+
X-сцепленный СА у мальчиков		
Базальная мембрана капилляров клубочка	-	-
Базальные мембраны канальцев, капсулы Шумлянского-Боумена	-	-
X-сцепленный СА у девочек		
Базальная мембрана капилляров клубочка	+/-	+/-
Базальные мембраны канальцев, капсулы Шумлянского-Боумена	+/-	+/-
Аутосомно-рецессивный СА		
Базальная мембрана капилляров клубочка	-	-
Базальные мембраны канальцев, капсулы Шумлянского-Боумена	-	+

рах почки (паттерн экспрессии <x3«-/+»a5«+/-»).

Таблица 2

Экспрессия «3 и «5 супъединиц Ко.і.іаісна IV піпа в нормі іт при наследственном нефрозе

- «-» — отсутствие окраски;
- «+» — положительное окрашивание;
- «+/-» — мозаичное окрашивание.

При аутосомно-рецессивном СА у детей обоих ПОЛОЙ отмечается отсутствие a3 и a5 в гломерулярной базальной мембране, однако сохраняется окрашивание a5 субъединицы в канальцевой базальной мембране.

Таким образом, при использовании ИГХ исследования с антителами к a3 и a5 субъединицам коллагена IV типа возможна не только постановка диагноза наследственного нефрита, но и определение типа наследования.

### 3. Электронно-микроскопическое исследование

Следующим этапом диагностики СА является электронная микроскопия. Для этого нефробиоптат фиксируют в растворе глутарового альдегида, а затем в растворе тетроксиде осмия. Далее материал дегидратируют в серии спиртов возрастающей концентрации, пропитывают и заливают смесью смол в формы. После полимеризации смол полученные блоки режут на ультратоме, срезы монтируют на медных сетках и окрашивают уранил-ацетатом и цитратом свинца. Срезы исследуют при помощи электронного микроскопа при увеличении 10 000 40 000.

Электронная микроскопия позволяет выявить ряд изменений в клубочках почки, характерных для СА:

- на ранних этапах развития заболевания характерно распространенное уменьшение толщины базальной мембраны капилляров клубочка (< 150 нм);

время или после инфекций дыхательных путей, физической нагрузки или после профилактических прививок. Протеинурия в большинстве случаев не превышает 1 г/сут, в начале заболевания может быть непостоянной, по мере прогрессирования процесса протеинурия нарастает. В дальнейшем происходит нарушение парциальных функций почек, ухудшение общего состояния больного: появляются интоксикация, мышечная слабость, артериальная гипотония, часто нарушения слуха (особенно у мальчиков), иногда нарушение зрения.

В начальной стадии болезни снижение слуха в большинстве случаев выявляется только с помощью аудиографии. Снижение слуха при СА может возникнуть в различные периоды детства, однако чаще всего тугоухость диагностируется в возрасте 6-10 лет. Снижение слуха у детей начинается с высоких частот, достигая значительной степени при воздушном и костном проведении, переходя из звукопроводящей в звуковоспринимающую тугоухость. Снижение слуха может быть одним из первых симптомов заболевания и может предшествовать мочевому синдрому.

## II. Морфологический этап диагностики 1.

### Световая микроскопия

Для приготовления гистологических препаратов нефробиоптаты дегидратируют в батарее спиртов восходящей концентрации с использованием тканевого процессора, заключаются в парафин с сохранением ориентации с использованием заливочного центра. Правильную ориентацию биоптата можно при использовании заливочного центра с холодной точкой. Из блоков изготавливают гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивают гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа, по Массону, серебрением по Джонсу и заключаются в канадский бальзам или аналогичную среду, покрывают покровным стеклом.

При светооптическом исследовании нефробиоптата в почечной ткани можно обнаружить следующие изменения:

- мезангиальная пролиферация различной степени выраженности сегментарная и/или глобальная, фокальная и/или диффузная в сочетании с расширением мезангиального матрикса;
- фокальный гломерулосклероз (сегментарный или глобальный);
- удвоение и утолщение базальных мембран капилляров клубочка;
- пенистые клетки в строме;
- очаговый интерстициальный фиброз.

Вышеописанные изменения не являются специфичными и могут встречаться при многих других первичных и вторичных гломерулопатиях. Для диагностики СА иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с антителами к иммуноглобулинам различных классов и фракциям компле-