

*И.А. Козыро¹, А.В. Сукало¹, Л.Б. Коростелева², Л.В. Картун¹,
Е.В. Ходосовская¹, Д.А. Черношей¹*

Клиническое значение некоторых антител и компонентов комплемента у детей с гломерулонефритом

*Белорусский государственный медицинский университет¹,
ГУ «РНПЦ Детской онкологии и гематологии»²*

В статье представлены результаты исследований отдельных показателей гуморального звена иммунитета (иммуноглобулинов А, М, G и компонентов комплемента С3, С4, маннан-связывающего лектина) при гломерулонефритах у детей. Впервые определена концентрация маннан-связывающего лектина у детей с острым постстрептококковым гломерулонефритом и люпус-нефритом. Ключевые слова: гломерулонефрит, иммуноглобулины, комплемент, дети

Гломерулонефрит (ГН)-иммунообусловленное гломерулярное повреждение, приводящее к воспалению, исходом которого будет или излечение, или хроническое прогрессирующее изменение почечной ткани. Несмотря на то, что роль основных классов иммуноглобулинов (Ig) в развитии ГН в настоящее время не вызывает сомнений, в доступной литературе относительно небольшое число публикаций, посвященных исследованию Ig при ГН. Ig относятся к специфическим гуморальным факторам иммунитета и выполняют следующие функции: 1) специфически распознают самые разнообразные антигены и гаптены; 2) взаимодействуют с другими иммунокомпетентными клетками, имеющими к ним соответствующие рецепторы; 3) активируют систему комплемента. Антитела класса IgM относятся к “ранним”, по структуре являются наиболее крупномолекулярными, слабоспецифичными, могут связывать сразу пять молекул антигена. Это ведет к образованию крупных ИК и способствует более быстрому выведению АГ из циркуляции, а также предотвращает возможность их прикрепления к клеткам и инициации патологического процесса. Известно, что агглютинирующая и комплементсвязывающая способности IgM в сотни раз активнее, чем у IgG. Согласно литературным данным, повышение концентрации IgM в сыворотке крови нередко отмечается при остром ГН либо обострении хронического ГН.

IgG являются основными АГ вторичного иммунного ответа (ИО). За счет активации комплемента, опсонизации и активации фагоцитоза, реализуют свою основную биологическую функцию – защиту организма от возбудителей инфекции и продуктов их жизнедеятельности. Обладая высокой специфичностью, они активно участвуют в ИО и одновременно регулируют его за счет других гуморальных и клеточных механизмов, определяя в конечном итоге его полноценность. По данным литературы в активной стадии нефротической и смешанной форм ГН происходит снижение сывороточного содержания всех 4 субклассов IgG и обнаруживается их потеря с мочой. При гематурической форме ГН и IgA-нефропатии, несмотря на отсутствие снижения IgG в сыворотке крови, выявляется экскреция IgG1 и IgG4, наблюдаемая как в активной стадии заболевания, так и в фазе частичной ремиссии. По данным исследований А.Тимофеевой (1996) падение концентрации субклассов IgG в крови и увеличение уровня их экскреции с мочой при наблюдении за больными с первичным ГН в

динамике, является прогностически неблагоприятным симптомом и свидетельствует о хронизации ГН [3].

Сывороточный IgA может активировать комплемент по альтернативному пути, способен обезвреживать микробы и токсины, циркулирующие в крови, однако его действие слабее, чем секреторного IgA [1, 4]. У больных с IgA-нефропатией средний уровень IgA в сыворотке выше, чем в контрольной группе, а при иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании ткани почки выявляются диффузные мезангиальные депозиты IgA.

Результаты исследования Е. Колупаевой (2000) свидетельствуют о дисбалансе различных классов Ig при ГН: снижение среднего уровня IgG отмечалось у 40% больных при остром ГН и у 59,6% в активной стадии хронического ГН. Достоверное увеличение уровня IgM по сравнению со здоровыми детьми выявлено у больных в фазе обострения хронического ГН ($p < 0,01$) [2].

Экспериментальные модели и исследование биоптатов почки человека при ГН демонстрируют наличие депозитов иммуноглобулинов и компонентов комплемента в гломерулах [5, 6]. В большинстве случаев иммунокомплексных нефритов активация комплемента происходит по классическому пути, доказательством чего является наличие депозитов IgM, IgG, C1q, C4, C3 и терминальных компонентов мембраноатакующего комплекса (МАК) C5-C9 в клубочках. Однако при гипокомплементемическом мезангиокапиллярном нефрите, остром постстрептококковом (ОПСГН) и некоторых других ГН приоритарным является активация альтернативного пути. В этом случае не обнаруживаются Ig, в то время как C3, пропердин и МАК определяются [7,8]. Для активации классического пути комплемента необходима связь его первого компонента C1q с Fc-фрагментами молекул IgG и IgM сыворотки, для альтернативного – участие Ig необязательно. В качестве маркеров, отражающих активацию классического пути используют концентрацию C4, а альтернативного – C3 сыворотки крови.

По данным Hisano S. и соавторов (2001, 2005) активация комплемента по лектиновому пути может способствовать развитию и усилению гломерулярного повреждения при СКВ, а также длительному сохранению изменений в моче у пациентов с болезнью Шенлейн-Геноха. Мезангиальные депозиты маннан-связывающего лектина (МСЛ) и МСЛ-ассоциированной протеазы определялись у 33% больных СКВ и у 50% больных с IgA-нефропатией [9].

Целью нашего исследования было изучение гуморальных специфических и неспецифических факторов иммунной защиты при первичном и вторичном ГН у детей.

Материал и методы

Нами обследованы 40 соматически здоровых детей (мальчиков – 21, девочек – 19, в возрасте от 5 до 17 лет, медиана по возрасту – 12) и 141 ребенок с ГН: 50 больных острым постстрептококковым (ОПСГН) (мальчиков – 24, девочек – 26, в возрасте от 3 до 17 лет, медиана по возрасту – 11), 19 больных острым постинфекционным ГН (ОПИГН) (7 мальчиков и 12 девочек, возраста от 2 до 17 лет, медиана 11), 57 детей с хроническим ГН (ХГН): 31 мальчик и 22 девочки, возраст 3-17 лет, медиана 12 и 15 больных системной красной волчанкой (СКВ) с люпус-нефритом (мальчиков – 6, девочек – 9, в возрасте от 10 до 17 лет, медиана по возрасту – 15). В группу детей с ХГН отнесены 3 ребенка с

быстро прогрессирующим ГН (БПГН) (1 мальчик и 2 девочки 11-15 лет) и 1 девочка с ревматическим васкулитом 15 лет. Дети с ГН находились на лечении в отделениях нефрологии и интенсивной терапии во 2-й детской городской клинической больнице в период с апреля 2002 по июнь 2007 года. Контрольную группу составили 40 соматически здоровых детей в возрасте от 5 до 17 лет, находившихся на лечении в отделении пограничных состояний и невротозов 2-ой ДГКБ в период с 2002 по 2004 годы. Обязательными условиями для детей контрольной группы перед нашими обследованиями были: отсутствие жалоб со стороны органов мочевой системы, любых воспалительных заболеваний в течение 3-х и более недель, предшествующих обследованию, нормальные показатели анализов крови и мочи. У этих детей все исследования проводились до начала специфической психотропной терапии.

Определение концентрации Ig сыворотки крови проводилось с использованием наборов “ИФА-Вектор Бест”. Используемый твердофазный метод иммуноанализа (ИФА) основан на принципе “сэндвича”. В лунки планшета с иммобилизованными моноклональными АТ (МКАТ) к Ig вносились калибраторы с известной концентрацией Ig, контрольный образец и исследуемые образцы сыворотки или плазмы. После инкубации в течение 30 минут планшеты отмывались, и вносился конъюгат. Образовавшиеся ИК выявляли ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена. Реакцию останавливали стоп-реагентом, результаты учитывали фотометрически (длина волны 450 нм – основной фильтр, 650 нм – референс-фильтр). Концентрацию Ig (в мг/мл) в исследуемых образцах определяли, нанося полученные значения оптической плотности на калибровочный график. Нормальные показатели: IgA=0,8-2,8, IgM=0,5-1,9, IgG=5,4-16,1 мг/мл. Исследования проводились на базе ЦНИЛ БГМУ.

Определение концентрации МСЛ проводилось методом ИФА с использованием тест-систем фирмы AntibodyShop, Дания. Разведенные образцы сыворотки или плазмы пациентов и калибраторы инкубировались с первичными антителами (АТ) к МСЛ, затем вносились биотинилированные МСЛ АТ, далее конъюгат, субстрат, и, наконец, реакция останавливалась внесением в лунки 0,5 М серной кислоты. Определялась оптическая плотность (ОП) (длина волны 450 нм) и с помощью построения калибровочной кривой ОП переводилась в концентрацию в нг/мл. Лица, имеющие концентрацию МСЛ менее 500 нг/мл, относились к МСЛ-дефицитным. Исследования проводились на базе кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии БГМУ.

Статистическая обработка данных проведена с помощью статистической программы GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Для непараметрических тестов (two-tailed Mann-Whitney, Fisher’s exact test и one-tailed Spearman rank correlation test) статистически достоверными считались значения $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований по определению концентрации Ig сыворотки крови представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови у детей с гломерулонефритом.

Группа детей	IgA (мг/мл) M ± m	IgM (мг/мл) M ± m	IgG (мг/мл) M ± m
Острый постстрептококковый ГН (период активных проявлений) (n=50)	1,447±0,094 ^{***}	1,064±0,092 ^{**}	11,88±0,755 ^{***}
Острый постинфекционный ГН (период активных проявлений) (n=19)	1,333±0,278	1,692±0,135 ^{***}	6,537±0,692 ^{***}
Хронический ГН (n=53) нефротическая форма: n=20	1,146±0,104 [†]	1,408±0,083 [†]	8,5±0,568 ^{***}
а) обострение (n=11)	1,068±0,236	1,777±0,179	4,582±0,483 ^{**}
б) ремиссия (n=9)	0,796±0,075	1,380±0,274	9,800±2,119 ^{***}
-гематурическая форма: n=23			
а) обострение (n=15)	1,498±0,212	1,495±0,143	10,39±0,529
б) ремиссия (n=8)	1,350±0,410	1,219±0,161	9,475±0,904
-смешанная форма: n=10			
а) обострение (n=6)	0,704±0,101	1,275±0,138 [†]	6,633±0,559
б) ремиссия (n=4)	0,950±0,184	0,663±0,109 [†]	6,675±0,479
Быстропрогрессирующий ГН (n=3)	1,033±0,335	1,117±0,296	9,467±2,533
Лолус-нефрит при СКВ : n=15	1,570±0,242 ^{**}	1,891±0,219 ^{***}	9,773±1,404 ^{***}
активный n=12	1,146±0,293	1,847±0,260	10,02±1,757
-неактивный n=3	2,067±0,033	2,067±0,419	8,8±0,693
Здоровые дети (n=40)	1,005±0,114 [†]	0,984±0,056 ^{***}	5,930±0,428 ^{***}

Примечание: достоверность различий: *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Достоверное снижение концентрации IgG отмечено в группе детей с хроническим ГН с нефротической формой в периоде обострения (4,582±0,483) по сравнению с больными, находящимися в периоде клинико-лабораторной ремиссии (9,800±2,119) (p=0,0087), что соответствует данным литературы. Общеизвестным является факт, что снижение сывороточной концентрации IgG вследствие повышенных потерь с мочой относит ребенка в группу риска по развитию инфекционных осложнений.

Существенных различий в концентрации IgA, IgM и IgG в группе детей с гематурической формой ГН в периоды обострения и ремиссии болезни не выявлено. У детей со смешанной формой в периоде обострения ГН обнаружено достоверное повышение концентрации IgM (1,275±0,138) по сравнению с фазой ремиссии (0,663±0,109) (p=0,009).

Достоверное увеличение концентрации IgA (p=0,0362), IgM (p=0,0002) и IgG (p=0,0001) отмечено у пациентов с хроническим ГН по сравнению со здоровыми детьми. Сравнивая результаты, полученные у больных ОПСГН и здоровых детей достоверное увеличение концентрации IgA (p<0,0001) и IgG (p<0,0001) сыворотки крови отмечено у больных ОПСГН, в то время как у детей с ОПИГН отмечено повышение концентрации IgM (p<0,0001) в сравнении с контролем. У детей с ОПИГН по сравнению с ОПСГН выявлено повышение IgM (p<0,0001) и снижение IgG (p<0,0001). У пациентов с ОПСГН в сравнении с группой хронического ГН наблюдались изменения: повышение IgA (p=0,0001) и IgG (p=0,0004), снижение IgM (p=0,0003), в то время как для больных ОПИГН характерным было снижение концентрации IgG (p=0,005) против группы с ХГН.

По сравнению с контролем, у пациентов с СКВ, ЛН отмечалось достоверное увеличение концентрации всех классов Ig: IgA (p=0,0037), IgM (p<0,0001) и IgG (p=0,0037). Выраженных отличий в содержании Ig между детьми с активным и неактивным ЛН не отмечено.

Результаты некоторых исследований отражены в графиках 1-6.

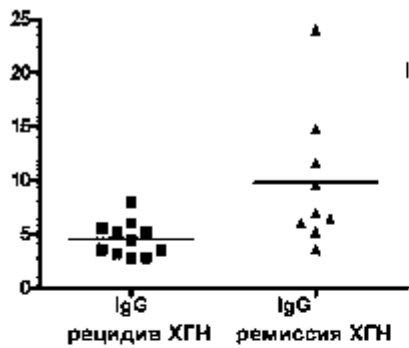


График 1. Концентрация IgG у больных ХГН нефротической формой в период обострения и ремиссии (p=0,0087).

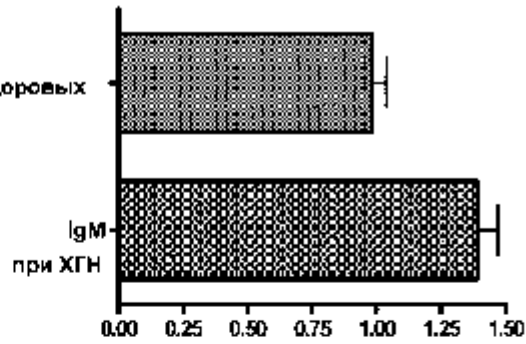


График 2. Концентрация IgM в сыворотке крови здоровых и больных ХГН (p=0,0002).

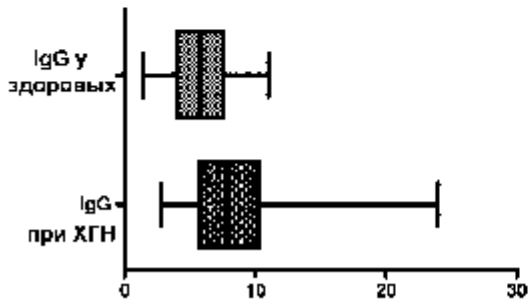


График 3. Концентрация IgG в сыворотке крови здоровых и больных ХГН (p=0,0001).

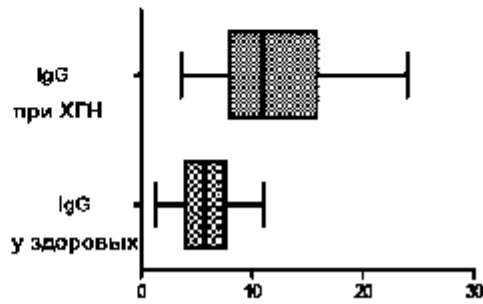


График 4. Концентрация IgG в сыворотке крови здоровых и больных ОПСГН (p<0,0001).

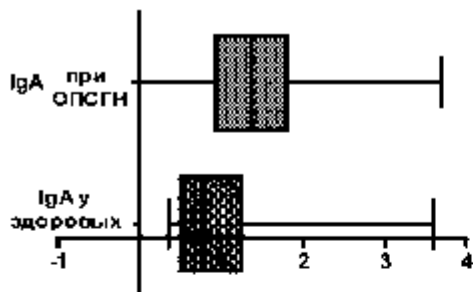


График 5. Концентрация IgA в сыворотке крови здоровых и больных ОПСГН (p<0,0001).

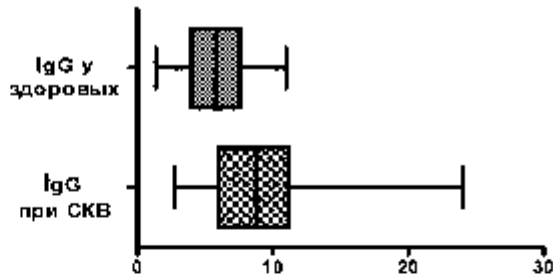


График 6. Концентрация IgG в сыворотке крови здоровых и больных СКВ (p=0,037).

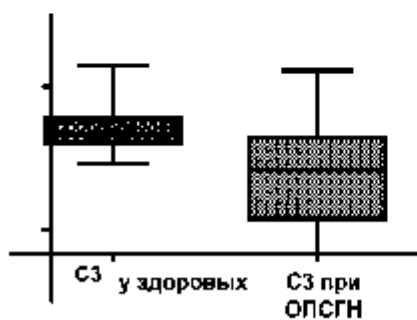


График 7. Концентрация C3 в сыворотке крови здоровых и больных ОПСГН (p<0,0001).

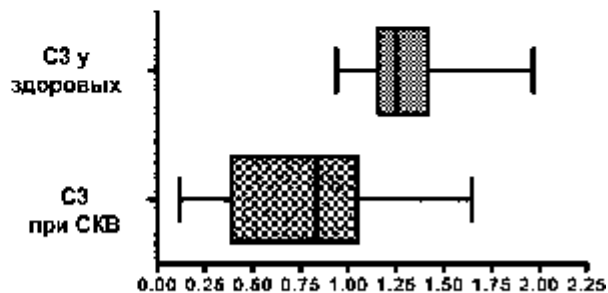


График 8. Концентрация C3 в сыворотке крови здоровых и больных СКВ (p=0,0003).

Исследование комплемента.

Концентрация C3 и C4 компонентов комплемента определялась методом иммунотурбидиметрии (Roche Diagnostics, Basel, CH) и использованием автоматического биохимического анализатора Hitachi 912 (нормальные значения для C3 – 0,9-1,8 г/л, для C4 – 0,1-0,4 г/л). Исследования проводились на базе РНПЦ детской онкологии и гематологии. Результаты полученных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Концентрация С3 и С4 комплемента в сыворотке крови у детей с гломерулонефритом.

Группа детей	С3 (г/л) М ± m	С4 (г/л) М ± m
Острый постстрептококковый ГН (период активных проявлений) (n=50)	0.816±0.077 ***	0.273±0,014 ¹
Острый постинфекционный ГН (период активных проявлений) (n=19)	1.715±0.116 ***	0.308±0,024
Хронический ГН (n=53) -нефротическая форма: n=20 а) обострение (n=11) б) ремиссия (n=9)	1.435±0,047 *** 1.524±0,094 1.627±0,157	0.335±0,017 ** 0.266±0.027 0.315±0.055
-гематурическая форма: n=23 а) обострение (n=15) б) ремиссия (n=8)	1.293±0,079 1.446±0.123	0.342±0.026 0.384±0.042
-смешанная форма: n=10 а) обострение (n=6) б) ремиссия (n=4)	1.502±0,097 1.208±0.077	0.453±0.062 0.309±0.059
Быстропрогрессирующий ГН (n=3)	1.303±0,109	0.412±0,054
Люпус-нефрит при СКВ: n=15 -активный n=12 -неактивный n=3	0.832±0,121 *** 0.830±0,151 0.840±0,090	0.233±0,036 ** 0.246±0,044 0.185±0,030
Здоровые дети (n=40)	1.305± 0,035 **	0.305±0,012 **

Примечание: достоверность различий: *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Существенное снижение концентрации С3 отмечалось в группе детей с ОПСГН в сравнении с контролем (p<0,0001), с группой детей с ОПИГН (p<0,0001) и пациентов с ХГН (p<0,0001). Сравнивая больных с ОПСГН и с ОПИГН, также определялась С3-гипокомplementемия в группе с ОПСГН (p<0,0001). По сравнению с контролем, у пациентов с СКВ, ЛН отмечалось достоверное снижение С3 (p=0,0003), в то время как между больными с активным и неактивным ЛН достоверно значимых различий не выявлено (p=0,943). Не получено достоверно выраженных различий также в группах детей с СКВ, ЛН и ОПСГН (p=0,882), детей с ХГН и контрольной группы (p=0,08), у больных нефротической формой ХГН в периоде обострения и ремиссии (p=0,403), гематурической формой (p=0,259), смешанной формой ХГН также в фазу обострения и ремиссии (p=0,114).

Достоверно значимая С3-гипокомplementемия отмечалась у детей с острым ГН по сравнению с хроническим ГН: ОПСГН против группы ХГН-(p<0,0001) и ОПИГН против ХГН (p=0,004).

Существенное снижение концентрации С4 комплемента отмечалось в группе детей с СКВ, ЛН в сравнении с контролем (p=0,004), в группе детей с ОПСГН по сравнению со здоровыми (p=0,047) и пациентами с ХГН (p=0,01). Между остальными группами достоверно выраженных различий не выявлено.

Результаты части наших исследований отражены в графиках 7-10.

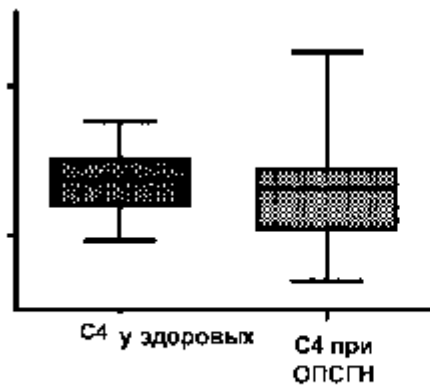


График 9. Концентрация С4 в сыворотке крови здоровых и больных ОПСГН ($p=0,047$).

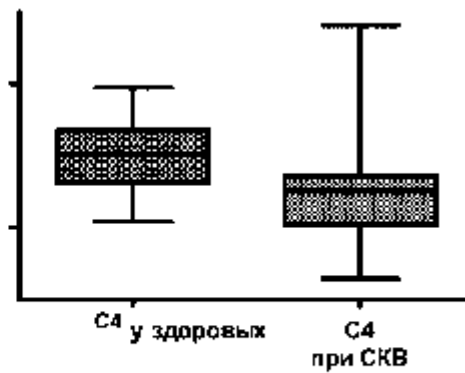


График 10. Концентрация С4 в сыворотке крови здоровых и больных СКВ ($p=0,004$).

Концентрация МСЛ в сыворотке крови была определена у 40 здоровых детей, 50 больных ОПСГН и 15 СКВ с ЛН. У здоровых детей концентрация МСЛ колебалась в пределах от 1450 до 4000 нг/мл ($M\pm m$: $3089\pm 146,3$), у детей с ОПСГН от 0,1 до 4000 нг/мл ($2146\pm 207,4$). Из 50 детей с ОПСГН концентрацию менее 500 нг/мл имели 8 человек (16%). У больных СКВ концентрация МСЛ колебалась в пределах от 0 до 4000 нг/мл, у 5 из них (30%) концентрация составила менее 500 нг/мл ($1447\pm 353,8$). Достоверные отличия (Mann-Whitney тест) были получены между группами здоровых детей и больных ОПСГН ($p<0,0014$), а также здоровыми и пациентами с СКВ ($p<0,0003$). Снижение концентрации сывороточного МСЛ у детей с ОПСГН и СКВ с люпус-нефритом отражает вовлечение лектинового пути комплемента при данной патологии.

Выводы

1. Существенное снижение концентрации IgG отмечалось в группе детей с нефротической формой хронического ГН в периоде обострения по сравнению с больными, находящимися в периоде клинико-лабораторной ремиссии ($p=0,0087$), что относит такого пациента в группу риска развития инфекционных осложнений основного заболевания.
2. Достоверное увеличение концентрации IgA ($p=0,0362$), IgM ($p=0,0002$) и IgG ($p=0,0001$) выявлено у детей с хроническим ГН, у пациентов с СКВ, ЛН (IgA ($p=0,0037$), IgM ($p<0,0001$) и IgG ($p=0,0037$)), у больных ОПСГН (IgA ($p<0,0001$) и IgG ($p<0,0001$)), у детей с ОПСГН (IgM ($p<0,0001$)) в сравнении со здоровыми детьми, что может являться одним из доказательств участия иммуноглобулинов в развитии иммунного повреждения при ГН.
3. Гипокомплементемия при ОПСГН по С3 ($p<0,0001$) и по С4 ($p=0,047$), а также достоверное снижение С3 ($p=0,0003$) и С4 ($p=0,004$) при СКВ с ЛН в сравнении с контролем – маркер участия комплемента в патогенезе повреждений гломерул при ОПСГН и СКВ у детей.
4. Снижение концентрации сывороточного МСЛ у детей с ОПСГН ($p<0,0014$) и СКВ с ЛН ($p<0,0003$) по сравнению со здоровыми детьми отражает вовлечение в патологический процесс лектинового пути комплемента при данной патологии.

Литература

1. Дранник, Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология. Одесса. 1999.
2. Колупаева, Е. А. Содержание половых гормонов и иммуноглобулинов в крови у детей с воспалительными заболеваниями почек. Здоровоохранение. 2000. № 1. С. 3-5.

3. Тимофеева, А. Г. Динамика содержания субклассов иммуноглобулина G в крови и моче при гломерулонефрите у детей: Автореферат диссертации... канд. мед наук: 14.00.09/НИИ педиатрии РАМН. 1996. 21 с.
4. Rees, L., Webb, N., Brogan, P. Paediatric Nephrology. Oxford University Press 2007. 618 p.
5. T.Martin Barratt, Ellis D.Avner, William E.Harmon Pediatric Nephrology. Fourth Edition, Lippincott Williams&Wilkins, A Wolters Kluwer Company.
6. Chester M. Edelmann, Pediatric Kidney Disease. Jr. Second edition. Little, Brown and Company Boston/Toronto/London. Vol.1: 356-361.
7. Rodriguez-Iturbe, B, Carr, RI, Garcia, R, Rabideau, D, Rubio, L, McIntosh RM (1980) Circulating immune complexes and serum immunoglobulins in acute poststreptococcal glomerulonephritis. Clin Nephrol 13(1): 1-4.
8. Whitley, K., Keane, W.F., Vernier, R.L. Acute glomerulonephritis. Med. Clin. North Am., 68: 259-279, 1984.
9. Hisano, S, Matsushita, M, Fujita, T, Iwasaki, H (2005). Activation of the lectin complement pathway in Henoch-Schonlein purpura nephritis. Am J Kidney Dis. Feb; 45(2): 295-302.