

© Т.В.Абрамова, Е.Г.Рыбакина, И.Г.Каюков, 2003
УДК [616.61-002.17:54-128.4].001.5

Т.В. Абрамова, Е.Г. Рыбакина, И.Г. Каюков

КОЛИЧЕСТВА КАТИОННЫХ БЕЛКОВ НЕЙТРОФИЛОВ И ЭКСПРЕССИИ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ И Fc γ -РЕЦЕПТОРОВ НА ИХ МЕМБРАНЕ ПРИ IgA-НЕФРОПАТИИ

T.V.Abramova, E.G.Rybakina, I.G.Kayukov

THE NUMBER OF NEUTROPHIL CATIONIC PROTEINS AND EXPRESSION OF COMPLEMENTARY AND Fc γ -RECEPTORS ON THEIR MEMBRANE IN IgA-NEPHROPATHY

Отдел общей патологии и патофизиологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН, Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия.

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – изучить корреляции количественных и функциональных показателей нейтрофильно-гранулоцитарных клеток при IgA-нефропатии у человека с функциональным состоянием почек и биохимическим составом крови. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Исследование проведено на 15 больных IgA-нефропатией. В качестве контроля была взята группа больных не-IgA мезангиально-пролиферативным гломерулонефритом (МезПГН), состоящая из 21 человека. Количество катионных белков нейтрофилов изучалось с помощью лизосомально-катионного теста. На мембране нейтрофилов исследовалась экспрессия эритроцитарных, комплементарных и Fc γ -рецепторов. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выявлены корреляции интенсивности экспрессии комплементарных и Fc γ -рецепторов на мембране нейтрофилов с уровнем протеинурии. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные нами данные позволяют предполагать, что одним из механизмов развития нарушения гломерулярного фильтра при IgA-нефропатии может быть механизм, опосредованный повышенным экзоцитозом катионных белков НГ. Возможно, C3b- и Fc γ -рецепторы мембраны НГ также участвуют в повреждении гломерулярного фильтра при IgA-нефропатии. Механизмы повреждения почечной ткани НГ при IgA-нефропатии отличаются от механизмов при МезПГН.

Ключевые слова: IgA-нефропатией, нейтрофил, катионные белки, C3b-рецептор, Fc γ -рецептор.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study the correlations of the quantitative and functional indices of the state of neutrophilic-granulocytic cells at IgA-nephropathy with the functional state of the kidneys and the biochemical composition of blood. **PATIENTS AND METHODS.** The investigation was performed in 15 IgA-nephropathy patients. The control group consisted of 21 patients with non-IgA mesangial-proliferative glomerulonephritis (Mes-PGN). The number of neutrophil cationic proteins was studied by the lysosomic-cationic test. Expression of erythrocytic, complementary and Fc γ -receptors was investigated on the neutrophil membrane. **RESULTS.** The correlation of intensity of expression of the complementary and Fc γ -receptors on the neutrophil membrane with the level of proteinuria was detected. **CONCLUSION.** The data obtained allow a suggestion that one of the mechanisms of the development of the glomerular filter in IgA-nephropathy might be a mechanism mediated by elevated exocytosis of cationic proteins of NG. C3b- and Fc γ -receptors of NG might also be involved in injuring the glomerular filter in IgA-nephropathy. The mechanisms of injury of the renal tissue with NG in IgA-nephropathy differ from the mechanisms in Mes-PGN.

Key words: IgA-nephropathy, neutrophil, cationic proteins, C3b-receptor, Fc γ -receptor.

ВВЕДЕНИЕ

IgA-нефропатия – самая распространенная форма первичного хронического гломерулонефрита, характеризующаяся мезангиальной пролиферацией, сегментарным склерозом клубочков и преимущественно гранулярными мезангиальными отложениями IgA, иногда сопровождаемыми отложениями IgG, C3c и фибриногена в ткани почки [1].

IgA-нефропатия была выделена в особую форму гломерулонефрита в 1968 году, но до сих пор этиология этого заболевания остается неизвестной [2]. Показано наличие структурной aberrации мо-

лекулы IgA при IgA-нефропатии [3]. Результаты исследования, проведенного T. Sano и соавт., продемонстрировали, что IgA, выделенный из крови больных IgA-нефропатией, является молекулой О-гликозилированной в шарнирной области и обладает так называемыми гломерулофильными свойствами [1]. Нарушения в строении молекулы IgA приводят к повышенному отложению иммунных комплексов с IgA в клубочках, за которым следует инфильтрация почечной ткани нейтрофильными гранулоцитами (НГ). На наличие гломерулярной нейтрофильно/моноцитарной инфильтрации

в период обострения IgA-нефропатии указывают многие авторы [4,5], хотя имеются данные, что при IgA-нефропатии лейкоцитарная инфильтрация в клубочках в основном представлена моноцитами/макрофагами [6]. Предполагается, что эти клетки участвуют в повреждении клубочков.

В литературе уделяется большое внимание окислительным механизмам деструкции почечной ткани при IgA-нефропатии. Имеются данные о высокой продукции активных форм кислорода нейтрофилами периферической крови, приводящей к выраженным гистологическим повреждениям почечной ткани при IgA-нефропатии [7]. Считают, что повышение активности НГ при IgA-нефропатии связано с особой формой IgA. Этот измененный иммуноглобулин вызывает мобилизацию кальция и продукцию свободно-радикального кислорода НГ [8]. Кроме того, продукция перекиси водорода НГ после стимуляции агрегированным IgG или зимозаном выше у больных IgA-нефропатией [4]. Н.С. Chen и соавт. исследовали воздействие нейтрофилов, активированных N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином, на выживаемость мезангиоцитов, продукцию эндотелина-1 и экспрессию мРНК эндотелина-1 мезангиальными клетками почечных клубочков крыс при их совместном культивировании. Показано, что НГ больных IgA-нефропатией повышали продукцию эндотелина-1 в значительно большей степени по сравнению с нейтрофилами больных мезангиально-пролиферативным гломерулонефритом (МезПГН) и здоровых доноров. Интенсивность экспрессии мРНК эндотелина-1 соответствовала степени повышения уровня эндотелина-1. Продемонстрирована гибель значительного количества мезангиальных клеток после инкубации с активированными нейтрофилами. Активированные N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином нейтрофилы больных IgA-нефропатией продуцируют больше супероксида, чем нейтрофилы больных МезПГН и здоровых доноров. Авторы сделали вывод, что активированные N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином нейтрофилы больных IgA-нефропатией повышают клеточную гибель и продукцию эндотелина-1 гломерулярными мезангиальными клетками через высвобождение супероксида [9].

Более точные механизмы и динамика развития повреждения почечной ткани активными формами кислорода не известны.

Нейтрофилы, по-видимому, также могут участвовать в повреждении почечной ткани при IgA-нефропатии, реализуя свои неокислительные механизмы. Нейтрофильные гранулы содержат много гидролитических ферментов и антимикроб-

ных полипептидов, которые могут вызывать повреждение стенок сосудов. Например, катионные белки, выделенные из лизосомальных гранул нейтрофилов, повышают сосудистую проницаемость *in vivo*. Протеазы разрушают базальную мембрану сосудов *in vivo* и *in vitro* и выделенная из нейтрофилов гепараназа быстро разрушает гепаран сульфат субэндотелиального вещества *in vitro* [10].

К.Н. Lai считает, что терапевтические попытки снизить повреждение почечной ткани при данном заболевании должны быть нацелены на предотвращение появления мезангиальных IgA-отложений и восстановление повреждений, вызванных инфильтрирующими нейтрофилами и высвободившимися цитокинами [3]. Таким образом, можно заключить, что НГ принимают активное участие в развитии IgA-нефропатии, но их механизмы в патогенезе данного заболевания недостаточно ясны.

Цель настоящей работы заключается в изучении корреляций количественных и функциональных показателей нейтрофильно-гранулоцитарных клеток при IgA-нефропатии у человека с функциональным состоянием почек и биохимическим составом крови.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 15 больных IgA-нефропатией. В качестве контроля была взята группа больных не-IgA МезПГН, состоящая из 21 человека. Все пациенты проходили обследование и лечение в нефрологических отделениях №1 и №2 клиники пропедевтики внутренних болезней Санкт-Петербургского государственного медицинского университета (СПбГМУ) им. акад. И.П. Павлова. У всех обследованных больных функция почек была сохранена. Обследование проведено до начала патогенетической терапии. Всем пациентам для установления диагноза хронического гломерулонефрита была проведена прижизненная нефробиопсия. Морфологическое исследование ткани нефробиоптата выполняли с помощью световой и иммунофлюоресцентной микроскопий. Диагноз IgA-нефропатии был поставлен на основании наличия отложений IgA, λ - и κ -легких цепей иммуноглобулинов в свежемороженых срезах почечного биоптата. У больных МезПГН отложения IgA в почечной ткани при иммунофлюоресцентном исследовании не были выявлены. Иммунофлюоресцентное исследование нефробиоптата было проведено нами в лаборатории клинической иммунологии и морфологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова НИИ нефрологии. Анализ срезов ткани почки на световом уровне выполняла

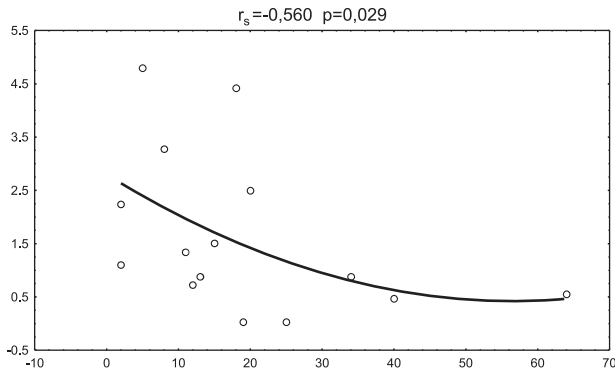


Рис.1. Корреляция интенсивности экспрессии C3b-рецепторов на мембране НГ с уровнем суточной протеинурии у больных IgA-нефропатией (ось ординат – суточная протеинурия, г/сут; ось абсцисс – НГ C3b.%).

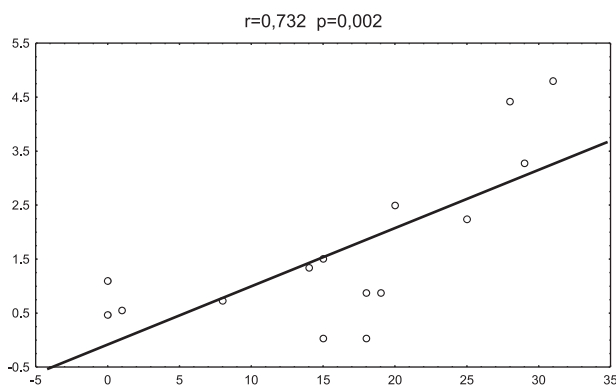


Рис.2. Корреляция интенсивности экспрессии Fcγ-рецепторов на мембране НГ с уровнем суточной протеинурии у больных IgA-нефропатией (ось ординат – суточная протеинурия, г/сут; ось абсцисс – НГ Fcγ.%).

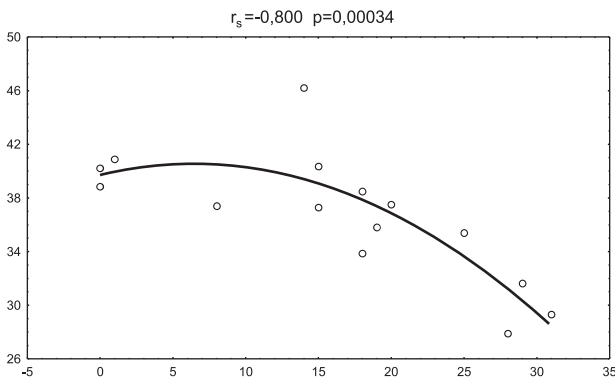


Рис.3. Корреляция интенсивности экспрессии Fcγ-рецепторов на мембране НГ с концентрацией сывороточного альбумина – у больных IgA-нефропатией (ось ординат – альбумин, г/л; ось абсцисс – НГ Fcγ.%).

с.н.с. И.К. Клемина. Изучение НГ было осуществлено на базе Отдела общей патологии и патофизиологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН. Забор крови для исследования НГ производили из локтевой вены в стандартных условиях (утром, натощак). Суммарное содержание катионных белков в НГ периферической крови определяли по методу В.Е. Пигаревского Лизосомально-катионным тестом

(ЛКТ) с последующим вычислением цитохимического показателя [11]. Изучение экспрессии рецепторов на мембране НГ проводили методом розеткообразования. НГ выделяли из гепаринизированной периферической крови в желатиновом градиенте. Для определения уровня экспрессии рецепторов к эритроцитам барана (Е) на мембране НГ использовали бараньи эритроциты, сохранявшиеся в консерванте Олсвера при $t = 4^{\circ}\text{C}$ до 10 дней, после трехкратного отмывания 0,9% NaCl и разведенных средой 199 до 0,5% концентрации. Для определения комплементарных (C3b) рецепторов на мембране НГ использовали метод розеткообразования с эритроцитами барана, сенсibilизированными антителами в присутствии мышиного комплемента. В качестве гемолитической сыворотки использовали сыворотку кроликов, иммунизированных эритроцитами барана [12]. Для выявления Fcγ-рецепторов на мембране НГ использовали человеческие эритроциты резус-отрицательной АВ (4) группы крови, фиксированные в 6% растворе формалина и обработанные IgG-антителами [13]. Подсчитывали процент клеток, образующих розетки по отношению к общему количеству лейкоцитов.

У обследованных пациентов выполняли исследование общего анализа мочи с определением уровня эритроцитурии и протеинурии. Кроме того, у этих же больных определяли суточную экскрецию белка с мочой (суточная протеинурия – СП). В целях определения функций почек исследовали скорость клубочковой фильтрации (СКФ), которая оценивалась по клиренсу эндогенного креатинина. В сыворотке крови измеряли концентрацию общего белка (ОБС), альбумина, мочевины и холестерина. Все эти исследования проводились дважды, в день забора крови на изучение состояния НГ и спустя 7–10 дней.

При статистической обработке данных вычисляли коэффициенты линейной корреляции Пирсона (r) и непараметрические коэффициенты Спирмена (r_s). За достоверные принимались значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В обеих группах значение цитохимического коэффициента ЛКТ и относительного содержания НГ, экспрессирующих на своей мембране эритроцитарные, Fcγ- и C3b-рецепторы, коррелировали с данными лабораторных исследований, полученными спустя 7–10 дней после анализа функций НГ периферической крови с большей достоверностью, чем с этими же данными, полученными в день исследования функций НГ.

У пациентов IgA-нефропатией величина ЛКТ коррелировала только с уровнем эритроцитурии

($r = -0,570$; $p = 0,026$). У больных МезПГН такой взаимосвязи не выявлено.

Обнаружена отрицательная непараметрическая корреляция уровня экспрессии эритроцитарных рецепторов на мембране НГ со скоростью клубочковой фильтрации у пациентов с IgA-нефропатией ($r_s = -0,567$; $p = 0,027$). Тогда как при не-IgA МезПГН выявлена прямолинейная положительная корреляция между уровнем экспрессии эритроцитарных рецепторов на мембране НГ и СКФ ($r=0,481$, $p=0,027$).

У пациентов с IgA-нефропатией относительное количество НГ, несущих на своей мембране C3b-рецепторы, корреляционно связано с концентрацией белка в моче ($r_s = -0,545$, $p=0,0357$) и, как и следовало ожидать, с суточной протеинурией, причем с более высокой степенью достоверности (рис.1). Однако ОБС и концентрация альбумина в сыворотке крови не коррелировали с уровнем экспрессии комплементарных рецепторов на мембране НГ периферической крови.

Интенсивность экспрессии Fcγ-рецепторов на НГ при IgA-нефропатии коррелировала с концентрацией белка в моче ($r=0,633$, $p=0,011$) и соответственно с большей степенью достоверности, с СП (рис. 2). Относительное содержание НГ с Fcγ-рецепторами на своей мембране непараметрически связано с ОБС ($r_s = -0,672$, $p=0,0061$) и с концентрацией альбумина в сыворотке крови (рис.3). У больных МезПГН таких взаимосвязей не выявлено. Следует подчеркнуть, что у этих пациентов интенсивность экспрессии Fcγ-рецепторов на НГ коррелирует с количеством эритроцитов в моче ($r=0,596$, $p=0,006$).

Корреляций изученных нами показателей функций НГ с уровнем лейкоцитурии, содержанием мочевины и холестерина в сыворотке крови выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая степень корреляции изменений показателей ЛКТ и выраженности эритроцитурии при IgA-нефропатии, вероятно, может быть связано с выходом катионных белков из НГ, которые могут повреждать гломерулярный фильтр. Это предположение косвенно подтверждает результаты исследований В.И. Наумовой и соавт., выявившие повышение трипсиноподобной протеазной активности и химотрипсиноподобной протеазной активности крови и мочи у детей, больных IgA-нефропатией [14]. Повышение трипсиноподобной протеазной активности может быть обусловлено присутствием в крови и моче нейтрофильного катепсина G, а химотрипсиноподобной – присутствием нейтро-

фильной эластазы. Эти данные, по мнению авторов, могли бы быть основанием для включения некоторых ингибиторов протеаз в комплексную терапию IgA-нефропатии.

Известно, что поражение почечной ткани при хроническом гломерулонефрите проявляется протеинурией. В 1997 году J.B. Lefkowitz были опубликованы данные, полученные на модели экспериментального гломерулонефрита. Показано, что миграция НГ в почечную ткань является комплементзависимой и опосредуется активацией β2-интегина [15]. При IgA-нефропатии нами выявлено, что концентрация белка в моче и уровень СП отрицательно коррелируют с относительным количеством в периферическом русле НГ, несущих C3b-рецепторы, которые соответствуют CD11b/CD18 и принадлежат классу β2-интегинов. Интерпретировать полученные данные, не изучая количество НГ, экспрессирующих C3b-рецепторы, в почке необходимо с большой осторожностью. Не исключено, что при низком уровне этих клеток в крови их количество в почечной ткани может быть увеличено. В этом случае, возможно, это связано с миграцией НГ, несущих C3b-рецептор, в почечную ткань и их повреждающим действием на гломерулярный фильтр. Т. Tang и соавт. (1997) на экспериментальной модели гломерулонефрита доказали усиление повреждения почечной ткани НГ активированными иммунными комплексами, адгезия которых была обусловлена поддерживающим эффектом C3b-рецептора. В этой же работе Т. Tang и соавт. указывают на функциональное взаимодействие Mac1 с Fcγ-рецепторами на мембране НГ [16]. Это объясняет полученные нами данные, касающиеся корреляции концентрации белка в моче, СП и интенсивности экспрессии Fcγ-рецепторов на мембране НГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные позволяют предполагать, что одним из механизмов развития нарушения гломерулярного фильтра при IgA-нефропатии может быть механизм, опосредованный повышенным экзоцитозом катионных белков НГ. Возможно, C3b- и Fcγ-рецепторы мембраны НГ также участвуют в повреждении гломерулярного фильтра при IgA-нефропатии. Механизмы повреждения почечной ткани НГ при IgA-нефропатии отличаются от механизмов при МезПГН.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sano T, Hiki Y, Kokubo T et al. Enzymatically deglycosylated human IgA1 molecules accumulate and induce inflammatory cell reaction in rat glomeruli. *Nephrol Dial*

Transplant 2002; 17 (1): 50 –56

2. Berger J, Hinglais N. Les depots intercapillaires d'IgA-IgG. *J Urol Nephrol* 1968; 74: 694-695

3. Lai KN. Future directions in the treatment of IgA nephropathy. *Nephron* 2002; 92 (2): 263-270

4. Chen HC, Tomino Y, Yaguchi Y et al. Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in patients with IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal* 1992; 6 (1): 35-39

5. Kincaid-Smith P, Nicholls K, Birchall I. Polymorphs infiltrate glomeruli in mesangial IgA glomerulonephritis. *Kidney Int* 1989; 36(6): 1108-1111

6. Soma J, Saito T, Ootaka T, Sato H, Abe K. Differences in glomerular leukocyte infiltration between IgA nephropathy and membranoproliferative glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 608-616

7. Ventura MT, Gesualdo L, Capobianco V et al. Effects of in vitro nutrient supplementation on polymorphonuclear cell respiratory burst in primary IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1995; 43 (1): 14-19

8. Lai KN, Leung JC. Heat-aggregated IgA prepared from patients with IgA nephropathy increases calcium mobilization and superoxide production of human neutrophils in vitro. *Nephron* 1993; 64 (1): 129-135

9. Chen HC, Guh JY, Chang JM, Lai YH. Differential effects of FMLP-activated neutrophils from patients with IgA nephropathy enhanced endothelin 1 production of glomerular mesangial cells. *Nephron* 2001; 89 (3): 274-279

10. Matzner Y, Bar NM, Yahalom J et al. Degradation of

heparan sulfate in the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils: Possible role in invasion through basement membranes. *J Clin Invest* 1985; 76: 1306-1313

11. Лизосомально-катионный тест. В.: Пигаревский ВЕ (ред.) *Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов*. Л. 1988: 87-102

12. Петрова ИВ, Шкурко ВИ, Арапова ОЮ, Васильева ЛП. Определение розеткообразующих клеток, комплемента и комплементфиксирующих антител в клинике аутоиммунных и иммунодефицитных заболеваний. Методические рекомендации. НИИ травматологии и искусственных органов МЗ СССР. М., 1980

13. Новиков Д.Н. *Справочник по клинической иммунологии и аллергологии*. Минск: Беларусь; 1987

14. Наумова ВИ, Михайлова ЗМ, Панченко ЕЛ и др. Течение и исход IgA-гломерулонефрита. *Тер архив* 1996; 6: 82-84

15. Lefkowitz J.B. Leukocyte migration in immune complex glomerulonephritis: role of adhesion receptors. *Kidney Int* 1997; 51(5): 1469-1475

16. Tang T, Rosenkrantz A, Assmann KZM et al. A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fcγ - receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *J Exp Med* 1997; 186 (11): 1853-1863

Поступила в редакцию 17.06.2003 г.