

УДК 577.325.7

СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА КРОВИ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ НЕФРОПАТИИ

© 2000 г. С.Г. Резван, В.В. Гусинская, В.Г. Артюхов, Н.А. Стародубцева, В.П. Ситникова, О.А. Жданова, О.А. Маркушева

Воронежский государственный университет

Одним из важных звеньев развития нефропатии является изменение структурно-функциональных свойств мембран различных типов клеток, в том числе эритроцитарных. Для оценки состояния эритроцитарной популяции и выявления особенностей реакции эритрона при нефропатиях у детей, нами был использован метод автоматической регистрации кинетических кривых гемолиза эритроцитарных клеток. При сравнительном анализе полученных экспериментальных данных было выявлено снижение (относительно контроля) осмотической резистентности эритроцитов крови больных на фоне увеличения числа кислотоустойчивых клеток.

Функциональную активность системы комплемента и отдельных ее факторов (C1g, C1-C5) у больных ГН определяли методом гемолитического титрования. Было показано, что проводимая терапия не приводит к нормализации показателей активности системы комплемента.

В последние десятилетия достигнуты значительные успехи в развитии нефрологии. Во многом это связано с прогрессом базисных наук - биологии, физики, химии. Внедрение в нефрологию достижений точных наук привело к пересмотру сохранявшихся многие годы этиологических и патогенетических концепций нефропатий.

Нефропатия - общее определение острых и хронических двусторонних поражений почек, не диагностический термин. Это собирательное понятие, охватывающее различные типы патологии почек, отличающиеся многообразием морфологических изменений: эндемическая, лекарственная, дисметаболическая, рефлюксная нефропатий и др. /1, 2, 7/.

Из большого числа нефропатий нами для исследования были выбраны состояния, сопровождающиеся гематурией (острая и хроническая формы нефрита у детей), в частности, гломерулонефрит. Гломерулонефрит (ГН)- приобретенное полиэтиологическое заболевание почек, для которого характерно иммунное воспаление с преимущественным, инициальным поражением клубочков и возможным вовлечением в патологический процесс любого компонента почечной ткани /2/.

Независимо от этиологии, первичным фактором генеза ГН является активация иммунопатологических

механизмов в гломеруле по одному из четырех типов реакций гиперчувствительности. Но полная клиническая картина ГН развивается лишь при включении неспецифических (дополнительных, ампликативных) факторов иммунитета: активации системы комплемента и пропердина, наличия лейкоцитов (особенно из моноцитарно-макрофагальной системы), локального освобождения простагландинов и других медиаторов воспаления, активации иммуногенетических факторов и ряда других систем организма.

В связи с вышесказанным оценка иммунного статуса больного ГН должна быть главнейшей составляющей диагностики этого заболевания и служить критерием эффективности проводимой терапии.

Одним из важных звеньев развития нефропатий является изменение структурно-функциональных свойств мембран различных типов клеток, в том числе эритроцитарных, механизм проникновения которых в мочу больного остается до настоящего времени предметом дискуссии /2, 3, 4, 7/. При нефритах происходит усиление процессов пероксидного окисления липидов мембран эритроцитов, активации эндогенных фосфолипаз, снижение активности антиоксидантных ферментов /3, 4, 5/. Устойчивость клетки к действию повреждающих факторов может выступать критерием ее состояния и состояния организма в целом /1, 5, 6/. В свя-

зи с этим к наиболее актуальным относится вопрос, касающийся изучения молекулярных механизмов повреждения эритроцитарных мембран при синдроме гематурии у детей. В связи с чем в задачи наших исследований входило изучение структурных свойств эритроцитов периферической крови больных с гломерулярным вариантом гематурии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки состояния эритроцитарной популяции и выявления особенностей реакции эритрона при нефропатиях у детей нами был использован метод автоматической регистрации кинетических кривых гемолиза эритроцитарных клеток. Кислотная и осмотическая резистентность эритроцитов крови больных является важным показателем, характеризующим проницаемость мембран этих клеток, состояние белковых структур и белково-липидных взаимодействий в эритроцитарной мембране.

В опытах были использованы суспензии эритроцитов, полученные из крови детей, страдающих различными формами нефропатии, степень резистентности клеток данной группы оценивалась по отношению к контролю. Кинетику гипоосмотического (0.55% NaCl) и кислотного (0.1н HCl) гемолиза эритроцитов регистрировали с использованием дифференциального фотоэлектрического колориметра марки ФЭК-56М, цифрового вольтметра В7-20 и двухкоординатного регистратора ЛКД4-003. В качестве основных кинетических параметров, характеризующих структурные свойства эритроцитов, были использованы: G_{max} - величина относительной степени устойчивости эритроцитов (%), K_{max} - константа, характеризующая максимальную скорость 50%-гемолиза (относит. единицы), $t_{лат}$ и t_{50} - время латентного и 50%-гемолиза, соответственно (с).

При сравнительном анализе полученных экспериментальных данных было выявлено (в общем случае) снижение (относительно контроля) осмотической резистентности эритроцитов крови больных на фоне увеличения числа кислотоустойчивых клеток.

При изучении кинетики кислотного гемолиза эритроцитов больных в период обострения заболевания были выявлены отклонения величин латентного времени гемолиза ($t_{лат}$) относительно контроля. У 50% пациентов величина $t_{лат}$ превышала контрольные значения в среднем на 17%, что по всей видимости, связано с повышением гидрофобизации эритроцитарной мембраны в результате лигандирования ее амфифильными метаболитами. Кроме того выявленный эффект увеличения данного показателя ($t_{лат}$) может быть обус-

ловлен преобладанием в популяции высокостойких к действию кислоты эритроцитарных клеток.

В то же время у второй половины больных в крови, наоборот, оказалось больше низкостойких эритроцитов ($t_{лат} < t_{лат(контроля)}$ в среднем на 27%), что свидетельствует о структурных повреждениях в эритроцитарных мембранах: могут иметь место изменения в белковых структурах, аполипидных областях, кластерных зонах, которые в конечном счете приводят к снижению гидрофобного барьера и увеличению скорости проникновения протонов через липидный бислой. В результате проведенной терапии величины $t_{лат}$ принимают сравнимые с контролем значения.

С целью выявления связи между интенсивностью патологических процессов при нефропатиях и структурным состоянием дискоцитов периферической крови больных детей был проведен анализ кинетических параметров кислотного и гипоосмотического гемолиза, полученных экспериментально (K_{max} , G_{max} , $t_{лат}$, t_{50}), в совокупности с клиническими показателями до и после стандартного курса лечения. К клиническим признакам активности нефропатии относят нарастание протеинурии, усиление гематурии, повышение АД, увеличение СОЭ. Нам удалось выявить определенную зависимость между кислотной резистентностью эритроцитов и клиническими показателями, характеризующими состояние больного. Так, после двухнедельного терапевтического курса лечения в условиях стационара величины K_{max} и G_{max} , а также $t_{лат}$, t_{50} приближались к контрольным. Стабилизация состояния больного подтверждалась нормализацией клинических показателей, которые в период обострения (до лечения) значительно превышали норму. Снижалось содержание эритроцитов и белка в моче, АД и СОЭ варьировали в пределах нормы.

Противоположная картина наблюдалась при рассмотрении показателей гипоосмотического гемолиза эритроцитов крови больных до и после курса лечения. У большинства пациентов после лечения величины K_{max} и G_{max} не только превышали контрольные значения, но и возрастали по отношению к кинетическим характеристикам осмотического гемолиза клеток крови в период обострения заболевания, несмотря на нормализацию при этом клинических показателей. Это является свидетельством того факта, что параметры гипоосмотического гемолиза позволяют судить о наличии скрытых повреждений в мембранах дискоцитов, не обнаруживаемых с помощью рутинных методов анализа.

Итак, в целом можно говорить о структурной модификации эритроцитарных мембран в патогенезе не-

фропатий, приводящей к снижению механической прочности и повышению кислотной резистентности клеток крови. Наблюдения за сдвигами резистентности эритроцитов в динамике заболевания, за постепенным переходом от периода повышения или понижения резистентности к нормальному уровню могут служить критерием степени прогрессирования нефропатий, а также показателем эффективности лечебных мероприятий.

Для изучения влияния проводимой терапии на иммунную систему больных ГН использовали тест на определение общей гемолитической активности системы комплемента ($C_{\text{общ}}$) и ее отдельных факторов (Clq, C1- C5), а также рассматривали изменения основных показателей иммунологического статуса. Функциональную активность системы комплемента определяли методом гемолитического титрования при добавлении к сыворотке крови больных (до и после курса лечения) специальных реагентов, представляющих собой лиофилизированную сыворотку крови человека с инактивированным тестируемым компонентом. Принцип действия реагентов основан на восполнении недостающего звена комплементарного каскада исследуемой сывороткой и гемолизе эритроцитов по классическому пути активации комплемента /8/. Результаты опытов учитывали визуально по первой лунке с неполным гемолизом. Функциональную активность системы комплемента и ее отдельных факторов выражали в логарифмах по основанию два соответствующего разведения сыворотки ($n = \log_2 x$).

В результате предварительно проведенного анализа было выявлено две группы больных: первая из них характеризовалась резким повышением (табл.1); а вторая - значительным снижением комплементарного статуса после проведенной терапии (табл.2).

В первую группу вошли больные ГН с нефритическим синдромом и больные ГН, являющимся следствием системной красной волчанки (СКВ). Больные ГН с нефритическим синдромом имели исходно средний или несколько завышенный уровень активности системы комплемента в целом и ее отдельных факторов (табл.1).

Таблица 1. Активность отдельных факторов системы комплемента у детей, больных ГН с нефритическим синдромом и СКВ, до и после лечения

Активность факторов, усл. ед.	C1	Clq	C2	C3	C4	C5	$C_{\text{общ}}$
До лечения	6,5 ср.	5,36 ср.	4,19 ср.	5,24 ср.	5,24 ср.	5,57 ср.	4,97 ср.
После лечения	10,27 в/в	8,06 в/в	6,51 в/в	8,24 в/в	7,01 в	8,16 в/в	6,89 в/в

Примечание: здесь и к табл.2 уровень активности факторов определялся по таблице в инструкции к реагентам: ср.-средний (норма), в - высокий, н - низкий, в/в и н/н - соответственно выше верхней и ниже нижней границы активности.

После проведения курса терапии у этих больных наблюдали почти во всех случаях повышение функциональной активности как отдельных факторов классического пути, так и $C_{\text{общ}}$ до высокого уровня и выше его. Выявленное нами повышение активности компонента представляется парадоксальным, тем более, если учесть, что проводимая терапия, основанная на антибиотиках (пенициллин, эритромицин, цефалоспирин), должна оказывать супрессивное действие на компоненты иммунной системы /9/.

У больных СКВ, входящих в эту же группу, был выявлен исходно несколько заниженный уровень активности комплемента, что не расходится с литературными данными /8/. После лечения по общепринятой методике глюкокортикостероидами (преднизолоном), антибиотиками, антикоагуляционными препаратами и витаминами наблюдалось повышение комплементарных показателей еще более резкое, чем у больных ГН с нефритическим синдромом.

По нашему мнению, такое повышение уровня активности комплемента после лечения может быть связано с одной из трех причин:

а) с некорректностью проводимой терапии, так как ряд исследователей /8/ считает, что практически все патологические состояния, проявлением которых является поражение собственных клеток организма, связаны с высоким уровнем функциональной активности комплемента, а успешность терапии проявляется в снижении таковой под воздействием нестероидных противовоспалительных средств, кортикостероидов, мягких цитостатиков;

б) регистрируемые показатели неадекватно отражают истинность процессов при активации комплемента: возможно, в завышенный уровень активности комплемента определен вклад вносит спонтанно образующийся деградированный комплекс C5b-6, вызывающий лизис клеток в условиях дефицита C1-C4, но в присутствии C7-C9 факторов комплемента (феномен «реактивного лизиса», открытый еще в 70-х годах /10/);

в) с переходом заболевания в острую фазу, о чем свидетельствует значительная разница в уровнях ак-

Таблица 2. Активность отдельных факторов системы комплемента у детей, больных острым ГН с нефритическим синдромом, до и после лечения

Активность факторов, усл. ед.	C1	C1q	C2	C3	C4	C5	C _{общ.}
До лечения	6,3 ср.	4,95 ср.	5,00 ср.	5,9 ср.	5,7 ср.	4,85 ср.	4,65 ср.
После лечения	3,3 н	4,1 н	2,65 н	3,65 н	3,9 н	3,45 н	3,8 н

тивности C1 и C1q (более 2 усл.ед.) у большинства детей из этой группы, тогда правомерно встает вопрос о необходимости продолжения лекарственной терапии, направленной на купирование скрытых патологических процессов в организме.

Анализ других показателей иммунологического статуса у данной группы больных позволил выявить некоторые отклонения в Т-клеточном звене иммунитета: завышенный уровень Т-лимфоцитов (в частности, Т-хелперов) у части больных свидетельствовал об острофазности заболевания, заниженный уровень Т-лимфоцитов у других больных являлся, по всей видимости, следствием истощения иммунной системы при хроническом течении болезни. У одного больного с СКВ наблюдалось резкое снижение уровня IgG, что может быть обусловлено связыванием иммуноглобулинов в иммунных комплексах, циркулирующих в крови и отложенных в стенках капилляров почек, суставов, кожи.

Во вторую группу вошли дети с острым ГН с нефритическим синдромом. Больные получали пенициллин, т.к. в этиологии острого ГН часто играют роль стрептококковые и стафилококковые инфекции, а также антикоагуляционные препараты. После лечения наблюдалось резкое снижение комплементарного уровня со среднего на низкий (табл.2).

На основании данных о динамике изменения комплементарного статуса у детей с различными формами ГН можно сделать предварительное заключение о том, что независимо от исходного уровня активности комплемента проводимая терапия приводит в большинстве случаев к резкому его повышению и, значительно реже, - к снижению. В обоих случаях нормализации показателей комплементарной активности не происходит, а значит, не происходит наступления состояния полной ремиссии, несмотря на улучшение основных клинических и биохимических показателей.

Таким образом, результаты проведенных нами комплексных исследований структурных свойств эритроцитов и функциональной активности системы комплемента крови детей, больных различными формами нефропатии, свидетельствуют о том, что применяемая лекарственная терапия снимает внешние симптомы заболевания, но не устраняет все патологические про-

цессы, протекающие на молекулярно-клеточном уровне. Для выявления и ранней диагностики их природы (с целью повышения эффективности проводимой терапии) необходимо разрабатывать более точные, высокочувствительные и адекватные методы и приемы биохимического, биофизического и иммунологического видов анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Справочник / под ред. проф. Карпищенко А.И. С. Петербург/Интермедика. 1997. 304 с.
2. Коровина Н.А., Гаврюшова Л.П., Шашинка М.А. Гломерулонефрит у детей. М.: Медицина. 1990. С. 8, 26 - 56.
3. Каримова Н.И. Влияние лечения на мембрано-деструктивные изменения и показатели коагулограммы у детей с первичным гломерулонефритом в условиях жаркого климата // Автореф. дис. ...к.м.н. М. 1989.
4. Крылов В.И. // Вопр. охр. материнства и детства. 1979. № 10. С.28 - 31.
5. Николаев А.Ю. // Тер. арх. 1988. № 6. С. 34 - 37.
6. Резван С.Г., Артюхов В.Г., Стародубцева Н.А. Исследование структурных свойств эритроцитов крови больных с синдромом гематурии // Физиология и психофизиология мотиваций. Воронеж. ВГУ. 1998. С. 30 - 33.
7. Справочник по нефрологии / под ред.Тареевой И.Е., Мухина Н.А. М.:Медицина. 1986. 432 с.
8. Козлов Л.В., Вавилова Л.М., Голосова Т.В. // Лаб. дело. 1984. № 12. С. 743 - 746.
9. Кудрин А.Н. Фармакология. М.: Медицина. 1991. С. 286 - 288.
10. McLeod B., Backer P., Gewurz H. // Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol. 1974. № 4. P. 623 - 632.