

УДК 616.61-008.6-036.12-097

## ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ HLA У ХВОРИХ НА ПІЄЛОНЕФРИТ

Гайсенюк Ф.З.<sup>1</sup>, Дріянська В.Є.<sup>2</sup>, Кругліков В.Т.<sup>2</sup>

Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика<sup>1</sup>, МОЗ України. ДУ «Інститут нефрології НАМН України»<sup>2</sup>

Пошук генетичних основ схильності до захворювань дозволив розкрити деякі механізми, які пояснюють зв'язок системи генів головного комплексу гістосумісності з захворюваннями через комбінацію різних HLA (human leucocyte antigens), які експресуються в різних локусах (I і II класів). Наявність фізіологічного взаємозв'язку антигенів системи HLA і імунного статусу обумовив розвиток такого напрямку як "HLA і захворювання", який дозволив установити кореляцію між певними генами комплексу гістосумісності і схильністю до розвитку деяких захворювань у людини [1-4].

Взаємозв'язок системи HLA з захворюваннями базується як на генетичній детермінованості (зчепленості), так і на генетичній асоціації. В першому випадку «патологічний» ген має істинне зчеплення з HLA комплексом, тобто локалізується в тій самій хромосомі. Проте, найчастіше зв'язок HLA і захворювань проявляється в формі асоціацій, коли може бути лише схильність до патології. Переважна більшість HLA-асоційованих хвороб має аутоімунний або імунодефіцитний компонент.

Дослідники передбачають цілий ряд механізмів, за допомогою яких гени, контролюючи імунну відповідь, здатні контролювати схильність або стійкість до захворювання, в тому числі хвороб нирок, за участю як аутоімунних, так і імунодефіцитних причин. Так, патогенез гломерулонефриту включає різні реакції клітинної і гуморальної ланок імунітету на чужі та свої антигени і закінчується утворенням цитотоксичних лімфоцитів, імунних комплексів, аутоантитіл з пошкодженням нирок [5, 6], при пієлонефриті аналогічні механізми сприяють знищенню бактеріального антигену, а слабка реакція на бактеріальний антиген у нирці з незадовільною його елімінацією сприяє виникненню хронічного пієлонефриту [7, 8]. В цих механізмах важлива роль у HLA-антигенів, пов'язана як з розпізнаванням антигенів, так і активністю Т-хелперів, ПК-клітин та макрофагів, що розглядається як прояв асоціативного зв'язку на клітинному рівні [9].

Результати генетичної схильності до хронічної хвороби нирок (ХХН), ГН, НС, в тому числі залежно від регіональних та національних особливостей, продовжують накопичуватися в різних країнах [10]. Існує проблема популяційного (міжетнічного) поліморфізму HLA – частота тих чи інших специфічностей антигенів гістосумісності на расовому/етнічному рівні (навіть в межах однієї нації) мають виражені відмінності, що пояснюють багатьма причинами. Тому актуальним є визначення

особливостей розподілу HLA в українській популяції, в тому числі у разі різних патологій.

**Мета дослідження** – визначити особливості HLA-фенотипів хворих на гострий пієлонефрит (ГПН) в порівнянні з розподілом як у здорових осіб, так і пацієнтів з ураженням нирок іншого генезу (гломерулонефритом), а також асоціативні зв'язки з виявленими збудниками ПН.

**Об'єкт і методи дослідження.** Відповідно до поставленої мети проаналізовано HLA-фенотип 364 хворих на хворобу нирок – 120 з них з ГПН та 244 – гломерулонефритом з нефротичним синдромом (ГН, НС) з метою виявлення особливостей не тільки при порівнянні із здоровими донорами, але й можливих акцентів у пацієнтів з такими різними ураженнями нирок як інфекційне запалення переважно інтерстицію (ПН) та імуноопосередкований процес з первинним ураженням клубочкового апарату (ГН). Хворі лікувались в ДУ «Інститут нефрології НАМН України» та кафедрі урології НМПО імені П.Л.Шупика. Контрольними групами були здорові донори-студенти м. Києва – для ПН це 120 (К1), а для ГН – 350 осіб (К2).

Постановка діагнозу базувалась на традиційних критеріях та передбачала в кожному випадку збір загального та спеціального анамнезу, дослідження клінічної симптоматики, застосування лабораторних, ендоскопічних, рентгенрадіонуклідних, ультразвукових, мікробіологічних (за наявності пієлонефриту) методів дослідження. Діагноз «гломерулонефрит» підтверджений методом нефробиопсії.

HLA-фенотип хворих визначали за методом стандартного лімфо-цитотоксичного тесту на планшетах Терасаки з застосуванням спеціальної панелі анти – HLA сироваток (20 антигенів локусу А, 31 – В, 9 – DR; РФ, С. Петербург).

Достовірність різниці у частоті визначення HLA-антигенів, що порівнювалися, оцінювали за допомогою критерію хі-квадрат для таблиць 2x2. Величину відносного ризику захворювання (RR) визначали за коефіцієнтом:

$RR = ab/vg$ , де а - кількість хворих, позитивних за даним антигеном, б – кількість осіб у контролі, негативних за даним антигеном, в – кількість хворих, негативних за даним антигеном, г – кількість осіб у контролі, позитивних за даним антигеном. При цьому значимими вважали показники  $RR > 2,0$  [2].

Етіологічну фракцію (атрибутивний ризик,  $\sigma$ ) підраховували за формулою:  $\sigma = (x - y)/(1 - y)$ , де x – частота антигену у хворих, а у – частота у здорових. Даний показник дає можливість об'єктивно оцінити причинну роль у етіопатогенезі захворювання одного з декількох антигенів-провокаторів, для яких RR складав  $> 2,0$ . Достовірним вважали показник  $\sigma$  більший 0,1. Якщо  $RR \leq 0,5$ , асоціацію розцінювали як достовірно негативну [2].

Крім аналізу різниці між частотою носіїв антигену в групі пацієнтів і в групі контролю та її статистичної значимості, яка дозволяє охарактеризувати силу асоціації між антигеном і хворобою, тобто ризик розвитку захворювання у носіїв антигену в порівнянні з тими, які даний антиген не несуть (критерій відносного ризику RR) і етіологічної фракції -  $\sigma$ , провели

порівняння долі для двох груп, використовуючи кутове перетворення Фішера (з урахуванням поправки Йетса). За методом Фішера рахували лише ті показники, де  $RR > 2$  один з показників був менше 10 (різниця достовірна якщо  $p < 0,05$ ).

Кількісне визначення бактерій та грибів проводили шляхом посіву матеріалу на тверді поживні середовища – кров'яний агар та агар Сабуро за Родоманом. Ідентифікацію виявлених бактерій проводили за Bergey's; чутливість бактерій до антибіотиків визначали методом стандартних дисків [11]. Кількісні показники мікробного навантаження в досліджуваному матеріалі визначали, враховуючи наступні градації: «вагома» бактеріурія –  $\geq 10^5$

колонієутворюючих одиниць в 1 мл сечі (КУО/мл) та «порогова» –  $10^2 - 10^4$  КУО/мл. Контамінацію сечі, за умов порогової бактеріурії, виключали за наявності тих самих збудників в зішкрябі зі слизової оболонки уретри.

**Результати та їх обговорення.** У хворих на ПН виявлено достовірне підвищення частоти HLA-A10 майже в 2 рази та A11 (35,4% в порівнянні з 11,4% у здорових,  $p < 0,05$ ) (табл. 1). З ГН асоційовані антигени HLA-A23, A24, A28 (табл. 1).

При ПН має місце достовірне зменшення частоти зустрічаємості у хворих антигену A2 (20,8%) при порівнянні з групою здорових донорів, де частота цього антигена складала 56% ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

**Таблиця 1 - Частота зустрічаємості HLA-A антигенів та критерій відносного ризику (RR) у хворих на ПН та ГН в порівнянні з контрольними групами здорових донорів (K1 та K2)**

Антигени	HLA-A					
	Частота в групі %			Частота в групі %		
	K1	ПН (120)	RR	K2	ГН (244)	RR
A1	35,7	27,0	0,6	28,0	27,1	0,955
A2	56,0	<b>20,8*</b>	0,2	49,4	47,9	0,94
A3	12,8	12,5	0,9	17,1	12,3	0,68
A9	24,2	30,5	2,0	20,0	11,8	0,54
						<b>p=0,011</b>
A10	13,5	<b>25,0*^</b>	<b>2,1</b>	17,1	13,9	0,79
A11	11,4	<b>35,4*^</b>	<b>4,0</b>	16,3	21,7	1,43
						p=0,150
A19	6,4	6,2	0,9	4,8	4,1	0,84
A23	2,1	<u>0</u>	-	2,3	6,9*	<b>3,2</b>
						<b>P=0,009</b>
A24	8,5	<u>0</u>	-	6,3	13,5*^	<b>2,33</b>
						<b>P=0,015</b>
A25	9,2	6,2	0,7	9,1	7,3	0,79
A26	7,8	6,2	0,7	6,3	5,3	0,84
A28	7,1	4,1	0,6	7,9	15,5*^	<b>2,13</b>
						<b>P=0,012</b>
A29	7,1	4,1	0,6	0,3	2,1	<b>7,16</b>
						P=0,379

Примітки: \* - різниця з контролем достовірна, ^ - етіологічна фракція

По локусу В відмічено достовірне підвищення частоти зустрічаємості при ПН антигенів B14 та B16 - 16,6% та 14,4% у порівнянні з 5% у здорових; а при ГН - B8, 38, 44 (табл. 2).

Достовірно більш рідко у хворих на ПН виявлялись наступні HLA-антигени: B21, B35 та B40 ( $p \leq 0,05$ ), а у пацієнтів з ХГН - B12, B16 та B18 (табл. 2).

**Таблиця 2 - Частота зустрічаємості HLA-B антигенів та критерій відносного ризику (RR) у хворих на ПН та ГН в порівнянні з контрольними групами здорових донорів (K1 та K2)**

Антигени	HLA-B					
	Частота в групі %			Частота в групі %		
	K1	ПН	RR	K2	ГН	RR
B5	15,0	23,0	1,8	16,0	13,1	0,79
B 7	22,8	33,0	1,7	20,8	22,5	1,09
B 8	10,7	8,3	0,5	13,4	28,6*^	<b>2,56</b>
						<b>p&lt;0,001</b>
B 12	20,0	14,5	0,7	20,8	9,8*	0,41
						<b>p&lt;0,001</b>
B 13	14,2	14,5	1,0	17,4	17,2	0,98
B 14	5,0	<b>16,6*^</b>	<b>3,8</b>	7,1	11,0	1,59
						p=0,165
B15	9,2	6,2	0,6	9,4	5,7	0,57
B 16	5,0	<b>14,5*^</b>	<b>3,2</b>	9,4	2,4*	0,24

						<b>p&lt;0,001</b>
B 17	13,5	<b>25,0*</b>	<b>2,1</b>	14,2	8,6	0,57
B18	5,0	8,3	1,7	8,2	3,2*	0,38
B 21	6,4	<b>2,0*</b>	0,3	5,7	7,3	<b>p=0,018</b>
B 22	2,1	<b>2,0</b>	0,9	5,1	4,9	1,32
B 27	10	6,2	0,6	8,2	11,4	0,95
B 35	22,0	<b>12,5*</b>	0,5	17,1	18,4	1,4
B 38				0,8	4,5*	1,1
B 40	12,1	<b>6,2*</b>	0,5	10,2	8,2	<b>5,05</b>
B 44				0,2	6,5*	<b>p=0,009</b>
						<b>23,45</b>
						<b>p&lt;0,001</b>

Примітки: \* - різниця з контролем достовірна, ^ - етіологічна фракція

Проведений аналіз асоціативних зв'язків особливостей HLA-фенотипу та виявлених у хворих збудників ПН. Визначали відносну частоту наявності (%) кожного з антигенів локусів А і В в підгрупах з виявленим патогеном (1) та без нього (2). В таблиці 3 показано результат порівняння долі для двох груп, і за локусом А в групі з наявністю *Escherichia coli* (*E. coli*) як найбільш поширеного збудника ПН [5] частіше

зустрічаються антигени А1, -3, -9, -10, -11, В5, -7, -13, -14, що логічно, тому що він виявлений майже у 70% хворих. Звертає увагу відсутність різниці за антигенами А2, -19, -25, -26, а також В8, -12, -35 (табл. 3), антиген В17 продемонстрував тенденцію до більш частішої зустрічаємості в групі з наявністю *E. coli* ( $p=0,074$ ).

**Таблиця 3 - Розподіл хворих, носіїв найбільш часто зустрічаємих HLA-антигенів, залежно від наявності *E. coli* як збудника ПН**

HLA-антигени локусу А	% хворих-носіїв антигену з виявленою <i>E.coli</i> (1)	P порівняно з іншими хворими (без <i>E.coli</i> ) (2)	HLA-антигени локусу В	% хворих-носіїв антигену з виявленою <i>E.coli</i> (1)	P порівняно з іншими хворими (без <i>E.coli</i> ) (2)
A1	84,4 (27/32)	$p<0,001$	B5	71,4 (20/28)	$p=0,004$
A2	48,0 (12/25)	$p=1,000$	B 7	62,5 (36/40)	$p=0,046$
A3	73,3 (11/15)	$p=0,032$	B 8	60,0 (6/10)	$p=0,658$
A9	83,8 (39/47)	$p<0,001$	B 12	52,9 (6/17)	$p=1,000$
A10	93,3 (12/25)	$p<0,001$	B 13	70,6 (12/17)	$p=0,044$
A11	86,0 (36/42)	$p<0,001$	B 14	85,0 (17/20)	$p<0,001$
A19	57,1 (36/42)	$p=1,000$	B 16	70,6 (12/17)	$p=0,044$
A25	57,1 (36/42)	$p=1,000$	B 17	53,3 (16/30)	$p=0,074$
A26	57,1 (36/42)	$p=1,000$	B 35	46,7 (7/15)	$p=1,000$

Цікаво, що виявлено достовірно більш низьку (менше ніж у половини хворих) зустрічаємість антигену А2 в групі з наявністю *E. coli*, що достовірно відрізнялось від частоти розподілу інших антигенів локусу А в цій групі – з А1 ( $p=0,010$ ), А9 ( $p=0,010$ ), А10 ( $p<0,001$ ), А11 ( $p=0,002$ ).

Можна констатувати, що не виявлено різниці частоти А2, В8, В12 та В35 залежно від наявності головного збудника ПН *E. coli*, хоча він є головним патогеном майже у 70% хворих з інфекційним запаленням нирок. Інші антигени, що найбільш часто зустрічаються в популяції, продемонстрували достовірно більш часту виявляємість саме в групі з цим збудником.

Не виявлено асоціації антигенів гістосумісності з іншими збудниками ПН.

HLA-A2, В8, В12 та В35 опосередковано асоціюють з меншою частотою виявлення *E. coli*, ніж інші Аг. Аналіз повідомлення інших дослідників, що працюють над проблемою генетичної детермінованості

захворювань, виявив деякі паралелі в отриманих результатах. Дослідженнями з використанням сучасних методів імуногенетики показано, що з антигенами В8 (за нашими даними, обумовлює етіологічну фракцію ХГН), В12, В35 пов'язують підвищену готовність до утворення імунних комплексів антиген-антитіло, а також певну чутливість до нефритогенних штамів стрептококів; HLA-B8 також має властивість активізувати клітинний імунітет та синтез цитотоксичних антитіл [12]. Цікаво, що антиген В8 асоціює з такими захворюваннями аутоімунного генезу (що свідчить про силу імунної відповіді) як цукровий діабет 1 типу, хронічний активний гепатит, дерматит, гіпертиреоз, хвороба Адісона, ішемічна хвороба серця, міастенія гравіс [2].

Найбільшу увагу привертає асоціація з меншою частотою виявлення (ніж можна було очікувати, орієнтуючись на наявність цього збудника у переважної більшості пацієнтів) антигенів-протекторів ПН А2 і В35. Можна передбачати, що ці антигени асоціюють з більш вираженою імунною відповіддю на *E. coli*, що і сприяє

достовірно меншій частоті їх зустрічаємості у хворих на ПН.

### Висновки

- Визначені антигени-провокатори (A10, A11, B14, B16, B17) та протектори (A2, B21, B35, B40) ПН.
- Для ГН такими, що несуть ризик захворювання та хронічного перебігу, є зовсім інші антигени - A23, A24, A28, A29, B8, 38, 44, так само як і протектори - B12 та B16.
- Антиген B16 є провокатором ПН, але протектором ГН, а відносний ризик ГН обумовлюють антигени A23, A24, які не виявлялись у жодного обстеженого хворого на пієлонефрит, що свідчить не тільки про різний етіопатогенез цих хвороб нирок, але й про різні генетичні механізми підвищеної схильності до пієло- та гломерулонефриту.
- HLA-A2 і B35 виступають як протектори ПН та асоціюють з меншою частотою виявлення *E. coli*, що дозволяє передбачати більш виражену імунну відповідь на *E. coli* у їх носіїв.
- Встановлені асоціації між такими різними захворюваннями нирок як пієло- та гломерулонефрит і антигенами HLA, які виявили антигени-провокатори ПН (A10, A11, B14, B16 та B17), дозволяють формувати групи підвищеного ризику та використовувати можливі превентивні терапевтичні заходи, а також більш активну терапію при ГПН для запобігання його хронізації, а у разі частого рецидивування – використання імунотерапії.

### References

1. Alekseev L. Associated with HLA risk risk to diseases and some of the mechanisms of its implementation / L. Alekseev, N. Khaitova, V. Yazdovskiy // Journal of Russian Academy of Medical Sciences. - 1998. - № 5. - P. 30 - 37.
2. Zaretskaya Yu. Clinical immunogenetics / Yu. Zaretskaya. - M. : Medicine, 1983. - 208 p.
3. Lutai M. Immunopatologicheskie response and immunogenetic causes of coronary heart disease / M. Lutai et al. // Journal of Ukrainian Academy of Medical Sciences.. - 2010. - Vol. 16, N 2. - P. 245-261.
4. Shabalov N. Diseases associated with HLA-antigens [Electronic resource] / N. Shabalov : http : www.vechnayamolodost. Ru / pages / poplem / svjazmezha5b.html.
5. Kolesnyk M. Spectrum of bacterial microflora of the urogenital tract in patients with pyelonephritis and its antibiotic sensitivity / M. O. Kolesnyk, A. V. Rudenko, V. T. Kruglikov et al. // Ukr. J. of Nephrology and Dialysis. - 2010. - N 4 (28). - P. 23-27.
6. Koryakova N. Pathogenic features of different clinical and morphological variants of glomerulonephritis / N. Koryakova // Nephrology. - 2005. - Vol. 9, N 1. - P. 58-62.
7. Rumyantsev A. Etiology and pathogenesis of pyelonephritis / A. Rumyantsev, N. Goncharova // Nephrology. - 2000. - T. 4, N 3. - P. 40-52.
8. Schieppati A. Progression of chronic Kidney Disease in : Primer on Kidney disease / A. Schieppati, R. Risoni. - 2005. - P. 446-450.
9. Gavrilenko T. Modern rationale for the participation of immunopathological reactions and genetic predisposition to their development in patients with coronary heart disease /

Gavrilenko T. et al. // Immunology and Allergology. - 2011. - N 1. - P. 93-94.

10. Zhao Jing-Jie. Association of human leukocyte antigen gene polymorphism and mesangial proliferative glomerulonephritis in a large population-based study / Jing-Jie Zhao [et al.] // Biomedical Reports. - 2013. - 152. - P. 751-756.

11. Birger M. Handbook of microbiological and virological research methods. - M. : Medicine, 1982. - 523 p.

12. Drannik G The antigen HLA-B8 as a possible risk factor in the development of diseases associated with an autoimmune component // G. Drannik et al. // Urology and Nephrology. - 1988. - N 6. - P. 20-23.

### PECULIARITIES OF HLA-PHENOTYPES IN PATIENTS WITH PYELONEPHRITIS

Haiseniuk F., Driyanska V., Kruglikov V.

**Introduction.** Of great interest are the studies on the role of human leucocyte antigens (HLA) in pathogenesis of a disease. The kidneys is vulnerable to injury in the context of inflammatory responses, with the potential involvement of a number of different inflammatory processes. There are shown the associative links of the HLA antigens which stipulate the relative and attributive risks of some autoimmune diseases, with immune disorder and high production of pro-inflammatory cytokines, that confirms their important role in immunopathogenesis. **The aim** was to determine the value of some HLA in the development of such important disease as pyelo- and glomerulonephritis.

**Material and Methods.** The distribution of HLA-A, B, DR antigens in 364 patients with kidney diseases (120 – pyelonephritis and 244 - glomerulonephritis) was analyzed. HLA antigens were defined using a standard microlymphocytotoxic test on the Terasakirs planchette with special panels of anti-HLA serums (20 antigens of locus A, 31 – B and 9 – DR). The control group consisted of 350 healthy donors – students from Kiev. The HLA antigen frequencies in normal and diseased subjects were compared taking each antigen separately, using  $\chi^2$  test. The etiologic fraction (attributive risk  $\sigma > 0.1$ ) was counted using the formula:  $\sigma = (x - y)/(I - y)$ , where x is frequency of antigen in patients and y – frequency in healthy. The  $\sigma$  reading was considered reliable when it exceeded 0.1.

**Results and discussion.** It is advisable to associate PN are A10, A11, B14, B16 и B17 ( $RR > 2$ ); the causal role ( $\sigma > 0.1$ ) was determined for A10, A11, B14, B16; antigens-protectors - A2, B21, B35, B40. Associated with CGN, NS ( $RR > 2$ ) are with antigens HLA- A23, 24, 28; B8, 38, 44 in patients; the causal role ( $\sigma > 0.1$ ) was determined for A24, 28; B8; antigens-protectors – B12, B16. The analysis of the associative features of HLA-phenotype and identified pathogens in patients with PN is carried out. HLA-A2 і B35 as protectors of PN associate with smaller frequency of presence the *E. Coli* in urine of patients. **Conclusion.** The article analyzes the peculiarities of HLA-phenotypes in patients with pyelo- and glomerulonephritis, which allowed to establish a correlation between certain genes of histocompatibility complex and susceptibility to develop some diseases of the kidneys in humans. The HLA-phenotype analysis and infection activators for PN allows to take into account the additional prognostic markers not

only of disease but also of its course, that provokes more individualized approach to the therapy of patients.

**Key words:** HLA-phenotype, pyelonephritis, glomerulonephritis, E Coli