

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ Ig E И ЦИТОКИНОВОГО БАЛАНСА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ НЕФРИТЕ

¹Городская клиническая больница скорой медицинской помощи,
Россия, 350042, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 14. Тел. 8-918-464-27-31;

²кафедра клинической иммунологии и лабораторной диагностики

Кубанского государственного медицинского университета,

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4

В работе представлены результаты исследования баланса Ig E, IL-4 и IFN- γ у больных хроническим нефритом с благоприятным исходом и неблагоприятным исходом терапии. Показано, что у больных с неадекватным ответом на проводимое лечение уровень IL-4 при поступлении достоверно превышает данный показатель здоровых лиц, что позволяет использовать его для прогноза отрицательной динамики патологического процесса.

Ключевые слова: хронический нефрит, адекватный и неадекватный ответ на терапию, IL-4, IFN- γ , Ig E, прогноз динамики патологического процесса.

N. A. FEDICHEVA¹, R. A. CHANFERAN², Z. A. AGEEVA¹

ESTIMATION OF AN OPPORTUNITY OF THE FORECAST OF DEVELOPMENT OF THE CHRONIC NEPHRITIS BY MEANS OF STUDYING OF LEVEL OF IG E AND CYTOKINES

¹Clinical city emergency hospital,

Russia, 350042, Krasnodar, 40-years of Victory st., 14. Tel. 8-918-464-27-31;

² faculty of clinical immunology and laboratory diagnostics of Kuban state medical university,

Russia, 350063, Krasnodar, Sedin st., 4

In work results of research of level Ig E, IL-4 and IFN- γ at patients with a chronic nephritis with a favorable outcome and a failure of therapy are presented. It has been proved, that at patients with the inadequate answer to spent of treatment the level of IL-4 prior to the beginning of therapy authentically above, than at healthy persons. It allows to use the given parameter for the forecast of an opportunity of negative dynamics of pathological process.

Key words: a chronic nephritis, the adequate and inadequate answer to therapy, IL-4, IFN- γ , Ig E, the forecast of dynamics of pathological process.

В последние годы резко усилился интерес к формированию прогностических моделей, использующих методы математической статистики и теории вероятностей [2, 3], однако в значительной мере не потеряли свое значение тесты, достоверное отличие которых в отдельных группах больных позволяет сделать обоснованный вывод о предполагаемом диагнозе или прогнозе. Хронический нефрит, являясь воспалительным заболеванием почек, характеризуется длительным течением, приводя в конечном итоге к развитию хронической почечной недостаточности (ХПН), в том числе требующей программированного гемодиализа. Наблюдения последних лет свидетельствуют о неуклонном повышении числа больных с различными нефропатиями, переходящими в ХПН [5, 6], особенно у социально активных лиц молодого и среднего возраста [1]. Учитывая, что стоимость одного сеанса гемодиализа составляет около 7 000 рублей, а проведение его необходимо обеспечить три раза в неделю, становится понятным социальное значение этого заболевания. В связи с этим важность разработки способов прогнозирования его исхода на ранних этапах лечения обуславливает актуальность данного исследования.

Целью настоящей работы явилось изучение концентрации иммуноглобулина E (IgE), интерлейкина-4

(IL-4) и γ -интерферона (IFN- γ) в крови больных, а также спонтанной и стимулированной фитогемагглютинином продукции этих веществ в культуре мононуклеаров у больных с хорошим и неудовлетворительным результатом лечения с целью поиска показателя, способного предсказывать направление динамики патологического процесса.

Материалы и методы

В работе изучены показатели иммунитета 27 больных с хроническим нефритом, находящихся на лечении в краевом нефрологическом центре. Вследствие того, что пункционная биопсия почки была выполнена у менее чем 1/3 всех больных, мы не проводили раздельного изучения показателей, включенных в исследование, ограничившись только определением клинических форм заболевания. Среди наших больных у 8 человек наблюдалась нефротическая форма заболевания, у 9 – гипертоническая, у 4 – гематурическая, у 5 – смешанная и, наконец, латентная форма была выявлена у одного больного. Распределение больных по формам заболевания отличалось от описанного в литературе популяционного распределения, очевидно, вследствие того, что латентная форма – наиболее часто встречающаяся в популяции – характеризуется слабой

выраженностью симптомов и встречается как случайная находка [4].

Возраст больных колебался от 16 до 77 лет, медиана составила 39 лет, нижний и верхний квартили распределения – 30 и 57 лет, соответственно.

Лечение проводили по стандартным методикам, утвержденным соответствующими приказами Министерства здравоохранения РФ. Результат лечения определяли путем экспертной оценки лечащими врачами по совокупности клинических и клинико-лабораторных признаков. Точнее указать признаки, на которых основывалась экспертная оценка, не представляется возможным, поскольку для разных клинических форм заболевания характерны различные проявления, и, соответственно, динамика улучшения состояния больных, скорость уменьшения патологических симптомов и степень выраженности остаточных явлений легли

в основу экспертной оценки. Экспертами явились три врача-нефролога высшей категории.

В I группу с удовлетворительными результатами лечения вошло 19, а во II, с неадекватным ответом на терапию, – 8 человек. В качестве контрольной группы была использована кровь 20 доноров (III группа).

Всем больным при поступлении и при выписке проводили общий анализ крови на полуавтоматическом анализаторе Micros CA 620. Концентрации Ig E и цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на реактивах фирмы «Immunotech» (Чехия). У больных при поступлении изучали концентрацию Ig E, IL-4 и IFN- γ в крови. Уровень Ig E в крови исследовали и при выписке на 21-й день. Для выяснения возможных механизмов патогенеза неадекватного ответа на терапию *in vitro* в 3-суточной культуре мононуклеаров изучали концентрацию IL-4 и IFN- γ

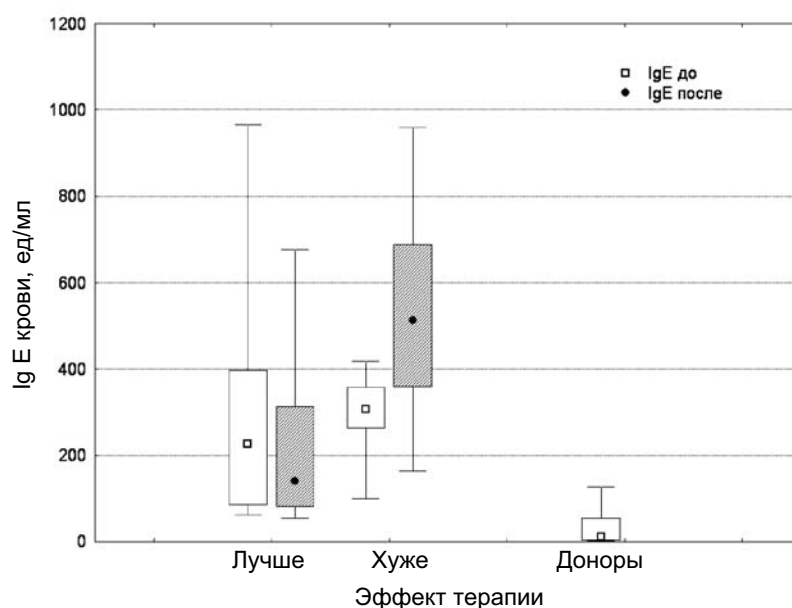


Рис. 1. Уровень Ig E крови у доноров и больных I и II групп до и после лечения

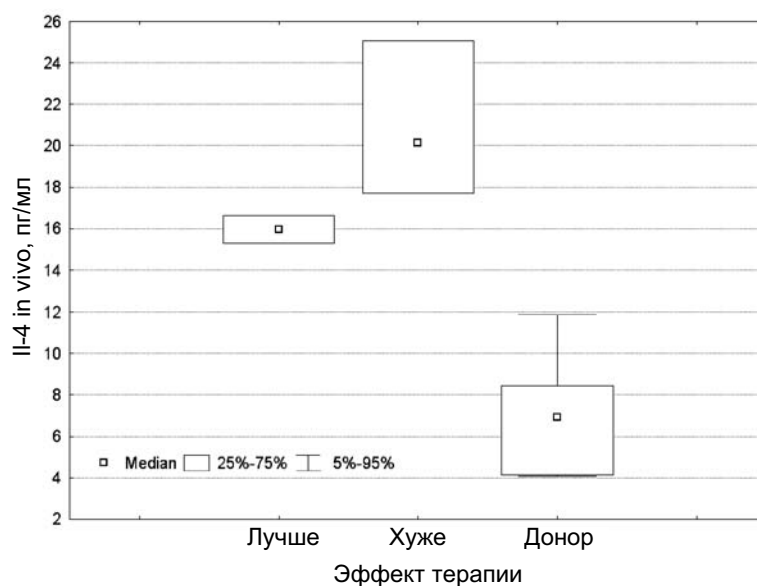


Рис. 2. Уровень IL-4 крови у доноров и больных I и II групп до лечения

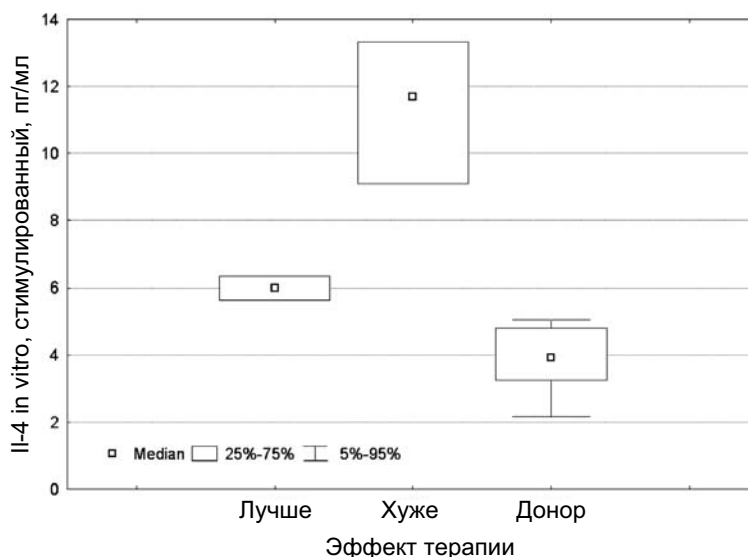


Рис. 3. Уровень IL-4 при стимуляции в культуре мононуклеаров у доноров и больных I и II групп до лечения

при поступлении, а также Ig E при поступлении и при выписке.

Выделенные в асептических условиях мононуклеары в концентрации 2×10^6 /мл инкубировали 72 часа при температуре 37°C . Стимуляцию синтеза цитокинов и IgE при культивировании мононуклеаров *in vitro* проводили путем добавления в среду фитогемагглютина (ФГА) в конечной концентрации 10 мкг/мл. После окончания инкубации среду центрифугировали и супернатант замораживали в морозильной камере при -20°C до момента проведения анализа. Сыворотку при исследовании *in vivo* также подвергали замораживанию. От момента замораживания биоматериала до проведения лабораторного исследования проходило не более 60 дней.

Статистическое исследование проводили методами непараметрической статистики с помощью критерия Краскела-Уоллиса для независимых признаков (сравнение групп между собой) и парного критерия Уилкоксона для зависимых признаков (динамика показателей внутри группы). Данные представлены в виде Me (p25;p75), где Me – медиана, p25 и p75 – нижний и верхний квартили распределения признаков, соответственно. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При поступлении содержание эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови больных обеих групп различалось не достоверно ($p > 0,05$). В I группе с хорошим результатом лечения концентрация гемоглобина и содержание эритроцитов составили $3,70 (2,80; 4,10) \times 10^9/\text{л}$ и $112 (84; 135) \text{ г/л}$, тогда как в группе с неудовлетворительными результатами лечения – $3,7 (3,25; 4,05) \times 10^9/\text{л}$ и $119,5 (102; 125) \text{ г/л}$, соответственно.

К моменту окончания лечения больных мы наблюдали достоверные отличия между группами по величине изучаемых показателей ($p < 0,001$). В I группе содержание эритроцитов выросло до $4,00 (3,80; 4,20) \times 10^9/\text{л}$, достоверно отличаясь в динамике от показателя при поступлении ($p < 0,001$), увеличившись в среднем на 0,30

($0,12; 1,10) \times 10^9/\text{л}$, а во II группе – уменьшилось до $3,10 (2,85; 3,50) \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$). В среднем уменьшение содержания эритроцитов во II группе составило $0,35 (0,60; 1,15) \times 10^9/\text{л}$. Подобные изменения имели место при анализе концентрации гемоглобина. В I группе больных концентрация гемоглобина в среднем выросла на $18,0 (3,0; 24,0) \text{ г/л}$, составив $124,0 (115,0; 124,0) \text{ г/л}$, достоверно отличаясь от величины изучаемого показателя при поступлении ($p < 0,01$). Во II группе концентрация гемоглобина относительно уровня при поступлении достоверно снизилась до $90,5 (85,0; 113,5) \text{ г/л}$, ($p < 0,025$), средняя величина уменьшения концентрации составила $10,5 (2,5; 32,0) \text{ г/л}$. Различия между группами после окончания лечения по критерию Краскела-Уоллиса высоко достоверны ($p < 0,005$).

В процессе исследования нами не было отмечено достоверных различий между больными этих групп ($p > 0,05$) по концентрации Ig E крови (рис. 1). В I группе она составила $227,35 (85,98; 397,48) \text{ ед/мл}$, а во II – $306,86 (264,56; 356,73) \text{ ед/мл}$. При этом уровень IgE больных I и II групп в $20 \div 30$ раз превышал уровень данного показателя здоровых – $11,88 (3,52; 54,15) \text{ ед/мл}$ ($p < 0,0001$).

После проведенного лечения в I группе больных с благоприятным течением заболевания концентрация Ig E в динамике уменьшилась в среднем на $21,7 (1,7; 141,3)$, составляя $140,3 (82,5; 311,9) \text{ ед/мл}$ ($p < 0,01$), тогда как во II группе имел место обратный процесс, и концентрация IgE увеличилась до $512,6 (359,2; 688,3) \text{ ед/мл}$ ($p < 0,05$). Среднее увеличение составило $177,9 (71,5; 389,0) \text{ ед/мл}$. Необходимо отметить, что абсолютная величина динамики концентрации изучаемого анализата достоверно различается ($p < 0,05$), то есть увеличение концентрации Ig E во II группе имеет более выраженный характер, чем уменьшение данного показателя в I группе, и, таким образом, при прогрессировании тяжести состояния имеет место более выраженная интенсивность динамики иммунологического ответа, чем у выздоравливающих больных. Различия между величиной изучаемого показателя в I и во II группах по критерию Краскела-Уоллиса достоверно

на уровне значимости $p < 0,01$; однако, несмотря на выраженное снижение концентрации IgE у больных I группы, различия с уровнем здоровых лиц остаются высоко достоверными ($p < 0,0001$).

При исследовании спонтанного и стимулированного синтеза IgE *in vitro* у больных обследованных групп также не выявлено достоверных различий ($p > 0,05$). В I группе концентрация IgEsp составила 0,08 (0,07; 0,12) ед/мл, а IgEst – 0,10 (0,08; 0,13) ед/мл, а во II группе – 0,09 (0,07; 0,19) ед/мл и 0,12 (0,11; 0,21) ед/мл, соответственно. Различия между спонтанным и стимулированным уровнем синтеза IgE мононуклеарами в условиях *in vitro* достоверны для обеих групп больных ($p < 0,025$).

У практически здоровых лиц спонтанный синтез IgE в культуре мононуклеаров составил 0,02 (0,01; 0,03), а при стимулировании синтеза ФГА – 0,03 (0,02; 0,04) ед/мл. Различия в величинах спонтанного синтеза IgE у доноров и больных достоверны на уровне значимости $p < 0,001$, а стимулированного синтеза – на уровне значимости $p < 0,0025$ для I и $p < 0,0005$ для II группы.

Изучение спонтанного синтеза IgE мононуклеарами *in vitro* после окончания лечения также показало отсутствие различий между I (0,08 (0,07; 0,12) и II (0,10 (0,08; 0,19) ед/мл) группами больных ($p > 0,05$). Напротив, при стимуляции синтеза IgE в присутствии фитогемагглютина концентрация данного анализа составила в I группе 0,08 (0,07; 0,11), а во II – 0,13 (0,12; 0,22) ед/мл ($p < 0,005$). Значительная активация стимулированного синтеза IgE у больных с неблагоприятным исходом хронического нефрита свидетельствует о значительной роли иммунного ответа аллергического типа в патогенезе данного заболевания.

Для уточнения особенностей реагирования гуморального иммунитета при хроническом нефрите были исследованы концентрации IL-4 и IFN- γ в крови здоровых и больных обеих групп, а также синтез данных цитокинов в культуре макрофагов.

При поступлении (рис. 2) концентрация IL-4 в крови больных I 15,96 (15,31; 16,61) пг/мл и II (20,12 (17,72; 25,06) пг/мл группы достоверно различаются ($p < 0,05$). При этом данный показатель здоровых лиц составляет 6,93 (4,16; 8,46) пг/мл, достоверно отличаясь как от концентрации IL-4 у больных II группы ($p < 0,001$), так и от изучаемого показателя в I группе больных ($p < 0,05$).

В культуре макрофагов без стимуляции у больных I группы в культуральной среде накапливается 5,74 (5,28; 6,19) пг/мл а во II группе – 7,41 (5,69; 9,94) пг/мл IL-4 ($p > 0,10$). У практически здоровых лиц уровень данного анализа составляет 3,25 (3,22; 4,08) пг/мл и, подобно концентрации данного интерлейкина в крови, различия с больными I ($p < 0,05$) и II групп достоверны ($p < 0,01$).

При стимулировании синтеза IL-4 с помощью добавления фитогемагглютина (рис. 3) соответствующие значения равны 5,98 (5,64; 6,32) пг/мл и 11,70 (9,10; 13,33) пг/мл ($p < 0,05$). Данный показатель у практически здоровых лиц составляет 3,92 (3,25; 4,81) пг/мл. При этом различия изучаемого показателя со здоровыми достоверны и в I ($p < 0,05$), и во II ($p < 0,001$) группах.

При поступлении у больных исследованных групп концентрация γ -интерферона в крови достоверно различалась ($p < 0,001$), составляя в I группе 110,65 (106,79; 114,51) пг/мл, а у пациентов II группы – 87,38 (84,59; 99,53) пг/мл. Уровень данного показателя у здоровых составил 179,01 (121,51; 192,9) пг/мл, что не отличалось от концентрации в крови больных I группы

($p = 0,09$) и достоверно превышало уровень, характерный для больных с неблагоприятным результатом лечения ($p < 0,005$).

Исследование продукции IFN- γ *in vitro* также показало существенные различия между обследуемыми группами. При отсутствии стимуляции концентрация IFN- γ в культуральной среде составила в I группе 54,99 (52,8; 57,17) пг/мл, а во II – 27,84 (24,44; 32,93) пг/мл ($p < 0,01$). Уровень показателя у здоровых лиц 151,54 (125; 164,82) пг/мл достоверно превышал аналогичный показатель у больных как I ($p < 0,01$), так и II группы ($p < 0,001$).

Стимулированный синтез IFN- γ у больных I и II групп составил, соответственно, 69,63 (68,85; 70,41) и 28,89 (26,35; 30,54) пг/мл ($p < 0,001$). Уровень здоровых лиц составил 168,83 (167,9; 188,89) пг/мл, различия групп больных по величине данного показателя в точности соответствуют структуре различий при отсутствии стимуляции.

Таким образом, можно отметить, что имеет место достоверное отличие концентрации изученных цитокинов, *in vivo* и *in vitro*. В случае культуральных исследований различие между группами имеет место как без стимуляции, так и в присутствии фитогемагглютина у больных II группы. Данное отличие, выявляемое до начала лечения, позволяет предположить возможность прогнозирования исхода терапии больных хроническим нефритом в самом начале лечения.

Высокий уровень Ig E у больных обеих групп, а также достоверные различия в концентрации антагонистических цитокинов позволяют говорить об аллергическом компоненте в развитии хронического нефрита, что будет проанализировано в другой нашей работе.

Учитывая вышеизложенное, можно сделать вывод, что научная значимость предлагаемого подхода заключается в возможности еще до начала терапии выделять группу больных, лечение которых с применением стандартных методик может оказаться неэффективным. К таким больным *a priori* могут быть применены более интенсивные методы терапии, снижающие вероятность неадекватного результата.

Практическая значимость обусловлена значительным социальным и экономическим эффектом, зависящим от повышения качества терапии, улучшения здоровья населения и, наконец, снижения расходов на повторные курсы терапии и возможные социальные выплаты. Значительная актуальность задачи исследования требует проведения дальнейшего научного поиска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев Р. А. Роль этиологических и других факторов в развитии хронической почечной недостаточности. – Нефрол. и диализ. – 2001. – № 3. – С. 358–364.
2. Генкин А. А. Новая информационная технология анализа медицинских данных (программный комплекс ОМИС). – СПб: Политехника. – 1999. – 191 с.
3. Жмудяк М. Л., Повалихин А. Н., Стребуков А. В. и др. Диагностика заболеваний методами теории вероятностей. – Барнаул: изд-во АлтГТУ, 2006. – 168 с.
4. Окорочков А. Н. Диагностика болезней внутренних органов: том 5. Диагностика болезней системы крови. Диагностика болезней почек. – М.: Медицинская литература. – 2001. – 512 с.
5. Чупрасов В. Б. Программный гемодиализ. – СПб, 2001. – 268 с.
6. Rutkowski B. Changing patient of end-stage renal disease in Central and Eastern Europe. – Nephrol. Dial. Transplant. – 2000. – № 15. – P. 156–160.

Поступила 04.08.2009