

# ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО БАЛАНСА И КОНЦЕНТРАЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНА Е У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ НЕФРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

Федичева Н.А.<sup>1</sup>, Багдасарьян А.С.<sup>1</sup>, Ханферян Р.А.<sup>2</sup>,  
Горбов Л.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Клинико-диагностическая лаборатория городской клинической больницы скорой медицинской помощи г. Краснодар

<sup>2</sup> Кафедра клинической иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФППВ Кубанского государственного медицинского университета, г. Краснодар

<sup>3</sup> Кафедра нормальной анатомии Кубанского государственного медицинского университета; курс оперативной хирургии Кубанского медицинского института, г. Краснодар

**Резюме.** В работе представлены результаты исследования баланса иммуноглобулина Е, интерлейкина-4 и  $\gamma$ -интерферона у больных хроническим нефритом в зависимости от исхода стандартного лечения. Результат лечения больных определялся экспертными заключениями лечащих врачей по результатам комплекса клинических и лабораторных исследований. Показано, что у больных с неадекватным ответом на проводимое лечение рост концентрации иммуноглобулина Е и изменения цитокинового баланса свидетельствуют о наличии сдвига дифференцировки наивных Th в направлении Th2 с развитием компонентов аллергического воспаления.

**Ключевые слова:** хронический нефрит, ответ на терапию, аллергическое воспаление.

*Fedicheva N.A., Bagdasarjan A.S., Khanferian R.A., Gorbov L.V.*

## FEATURES OF CYTOKINE BALANCE AND IMMUNOGLOBULIN E CONCENTRATIONS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC NEPHRITIS DEPENDING ON TREATMENT OUTCOMES

**Abstract.** The paper presents comparative data concerning immunoglobulin E balance, as well as IL-4 and IFN $\gamma$  amounts, in the patients with chronic nephritis with a favorable outcome vs. therapy failure after a standardized treatment. Results of treatment applied were evaluated by expert conclusions of the doctors, according to analysis of clinical and laboratory data. It has been shown that initial levels of IL-4 prior to the beginning of therapy were increased in the patients with inadequate response to therapy, as compared to healthy persons. Moreover, the patients with inadequate response to the treatment exhibited an increase in IgE concentrations and altered cytokine balance, thus suggesting a differentiation shift from naive Th to Th2 type, accompanied by development of allergic inflammation. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 343-348)

**Keywords:** chronic nephritis, response to therapy, allergic inflammation.

### Адрес для переписки:

Горбов Леонид Валентинович  
350075, г. Краснодар, ул. Селезнева, 102, кв. 120.  
Тел.: (961) 523-21-75.  
E-mail: hamp2@rambler.ru

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 это затрагивает группу активных лиц молодого и среднего возраста [1]. Высокая стоимость каждого сеанса гемодиализа и необходимость его регулярного проведения обуславливает высокое социальное значение этого заболевания.

В патогенезе нефрита ключевую роль играет иммунопатологический процесс, запускаемый фиксацией циркулирующих иммунных комплексов на базальной мембране мальпигиевых клубочков. Поэтому в течение нескольких десятилетий вопросы иммунологических изменений при хроническом нефрите остаются перманентно актуальными на фоне все более усложняющихся методов проводимых исследований. Опубликованные результаты исследований, вместе с тем, характеризуются значительной противоречивостью [3, 4] и относительной неполнотой. В частности, на протяжении практически всего периода иммунологических исследований у больных нефритом практически не уделялось достаточно внимания роли иммуноглобулина Е (IgE) в патогенезе данного заболевания.

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

и  $\gamma$ -интерферона (IFN $\gamma$ ) в крови больных, а также продукции этих цитокинов в культуре мононуклеаров (спонтанной и стимулированной фитогемагглютинином) у больных с хорошим и неудовлетворительным результатом лечения в попытке уточнить патогенез прогрессирующей динамики патологического процесса.

## Материалы и методы

В работе изучены показатели иммунитета 27 больных с хроническим нефритом, находящихся на стандартном лечении в краевом нефрологическом центре. Результат лечения определяли путем экспертной оценки лечащими врачами по совокупности клинических и лабораторных признаков. В I группу с удовлетворительными результатами лечения вошло 19, а во II группу с неадекватным ответом на терапию — 8 человек. В качестве контрольной группы была использована кровь 20 доноров (III группа).

Концентрацию IgE и цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на реактивах фирмы «Immunotech» (Чехия). У больных при поступлении изучали концентрацию IgE, IL-4 и IFN $\gamma$  в крови. Уровень IgE в крови исследовали и при выписке на 21 день.

**ТАБЛИЦА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ НЕФРИТОМ ПРИ БЛАГОПРИЯТНОМ И НЕБЛАГОПРИЯТНОМ ИСХОДЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, МЕ(P25; P75)**

Показатель	Доноры, III группа	I группа до лечения	I группа после лечения	II группа до лечения	II группа после лечения
IgE крови, ед/мл	11,88 (3,52;54,15)	227,35 (85,98;397,48) ***	140,3 (82,5;311,9) ***, ††	306,86 (264,56; 356,73) ***	512,6 (359,2;688,3) ***, †, ●●
IgE <sub>sp</sub> (МПК), ед/мл	0,02 (0,01;0,03)	0,08 (0,07;0,12) ***	0,08 (0,07;0,12) ***	0,09 (0,07;0,19) ***	0,10 (0,08;0,19) ***
IgE <sub>st</sub> (МПК), ед/мл	0,03 (0,02;0,04)	0,10 (0,08;0,13) ***	0,08 (0,07;0,11) ***	0,12 (0,11;0,21) ***	0,13 (0,12;0,22) ***, ●●
IL-4, пг/мл	6,93 (4,16;8,46)	15,96 (15,31;16,61) *		20,12 (17,72;25,06) ***, ●	
IL-4 <sub>sp</sub> (МПК), пг/мл	3,25 (3,22;4,08)	5,74 (5,28;6,19) *		7,41 (5,69;9,94) **	
IL-4 <sub>st</sub> (МПК), пг/мл	3,92 (3,25;4,81)	5,98(5,64;6,32) *		11,70 (9,10;13,33) ***, ●	
IFN $\gamma$ , пг/мл	179,01 (121,51;192,9)	110,65 (106,79;114,51)		87,38 (84,59;99,53) **, ●●●	
IFN $\gamma$ <sub>sp</sub> (МПК), пг/мл	151,54 (125;164,82)	54,99 (52,8;57,17) **		27,84 (24,44;32,93) ***, ●●	
IFN $\gamma$ <sub>st</sub> (МПК), пг/мл	168,83 (167,9;188,89)	69,63 (68,85;70,41) **		28,89 (26,35;30,54) ***, ●●●	

**Примечание.** \*, \*\*, \*\*\* – достоверные различия с группой доноров (III) с уровнем значимости  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , соответственно; ●, ●●, ●●● – достоверные различия показателя в I и II группах с уровнем значимости  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , соответственно; †, †† – достоверные различия показателя в I или II группе в динамике лечения с уровнем значимости  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно.

Для выяснения возможных механизмов патогенеза неадекватного ответа на терапию *in vitro* в 3-суточной культуре мононуклеаров изучали концентрацию IL-4 и IFN $\gamma$  при поступлении, а также IgE при поступлении и при выписке.

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

Статистическое исследование проводили методами непараметрической статистики с помощью критерия Манна–Уитни 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

В процессе исследования крови больных I и II групп (рис. 1) нами не было отмечено достоверных различий по концентрации IgE крови между ними ( $p > 0,05$ ). При этом уровень данного показателя у больных I и II групп в несколько десятков раз превышал уровень IgE здоровых ( $p < 0,0001$ ). Все цифровые данные, используемые в работе, приведены в таблице.

После проведенного лечения в I группе больных с благоприятным течением заболевания концентрация IgE в динамике уменьшилась в среднем на 21,7 (1,7;141,3) ед/мл (рдо-после  $< 0,01$ ), тогда как во II группе имел место обратный процесс и концентрация IgE увеличилась на 177,9 (71,5;389,0) ед/мл (рдо-после  $< 0,05$ ). Необходимо отметить, что медиана концентрации IgE во II группе возрастает на 58% от исходного уровня, а в I группе уменьшается на 9,6% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, при прогрессировании тяжести состояния имеет место более выраженная интенсивность динамики иммунологического ответа, чем у больных с благоприятным течением заболевания. При этом, несмотря на уменьшение в процессе лечения концентрации IgE у больных I группы, различия с уровнем здоровых лиц остаются высоко достоверными ( $p < 0,0001$ ).

Изучение культуральных свойств МПК, в отличие от исследований содержания изучаемых веществ в цельной крови, позволяет если не полностью, то хотя бы частично уменьшить влияние

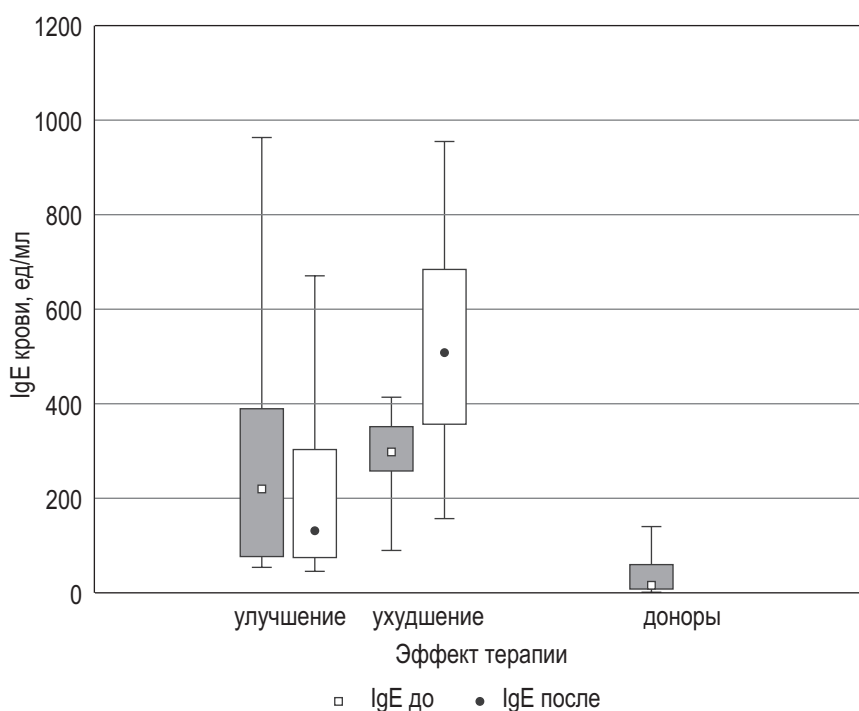


Рисунок 1. Уровень IgE крови у доноров и больных I и II групп до и после лечения

на эти клетки других клеточных элементов иммунной системы. При исследовании спонтанного и стимулированного синтеза IgE *in vitro* у больных обследованных групп также не выявлено достоверных различий между ними ( $p > 0,05$ ). В то же время, различия спонтанного синтеза IgE у доноров и больных достоверны на уровне значимости  $p < 0,001$ , а стимулированного синтеза — на уровне значимости  $p < 0,01$  для I и  $p < 0,001$  для II группы.

Изучение спонтанного синтеза IgE моноуклеарами *in vitro* после окончания лечения также показало отсутствие различий между I и II группами больных ( $p > 0,05$ ). Напротив, при стимуляции синтеза IgE в присутствии фитогемагглютина концентрация данного анализа у больных II группы достоверно превышает аналогичный показатель в группе с благоприятным течением заболевания ( $p < 0,005$ ).

Для уточнения особенностей реагирования клеточного иммунитета при хроническом нефрите были исследованы концентрации IL-4 и IFN $\gamma$  в крови больных обеих групп при поступлении и здоровых, а также синтез данных цитокинов в культуре МПК.

При поступлении (рис. 2) нами обнаружены достоверные различия в концентрации IL-4 в крови больных с благоприятным и неблагоприятным течением заболевания ( $p < 0,05$ ). При этом его уровень и в I ( $p < 0,05$ ), и во II ( $p < 0,001$ ) группах достоверно превышает показатель здоровых лиц.

В культуре МПК без стимуляции, напротив, различия в концентрации IL-4 у больных обеих групп не достоверны, однако также превышают соответствующий показатель у доноров с уровнем значимости ( $p < 0,05$ ) и ( $p < 0,01$ ) для больных I и II групп, соответственно.

При стимулировании синтеза IL-4 в культуре МПК его концентрация во II группе возрастает более значительно, чем у больных с благоприятным течением ( $p < 0,05$ ). При этом различия со здоровыми также достоверны и в I ( $p < 0,05$ ), и во II ( $p < 0,001$ ) группах.

Другой изученный цитокин — IFN $\gamma$ , у больных I группы достоверно превышал соответствующий показатель в группе больных с неблагоприятным течением ( $p < 0,001$ ). По величине его уровня не зарегистрировано достоверных различий между III и I группами. В то же время у больных с неблагоприятным результатом лечения различия с донорами оказались высоко достоверны ( $p < 0,005$ ).

Исследование продукции IFN $\gamma$  в культуре МПК также показало существенные различия между исследуемыми группами. При отсутствии стимуляции концентрация IFN $\gamma$  в культуральной среде в I группе была достоверно выше, чем во II ( $p < 0,01$ ) и, вместе с тем, показатель здоровых лиц достоверно превышал уровень больных обеих групп ( $p < 0,01$ ).

Стимулированный синтез IFN $\gamma$  в культуре МПК у больных I группы также достоверно превышал уровень II группы ( $p < 0,001$ ), а у здоровых лиц был в 2÷5 раз выше, чем у больных обеих

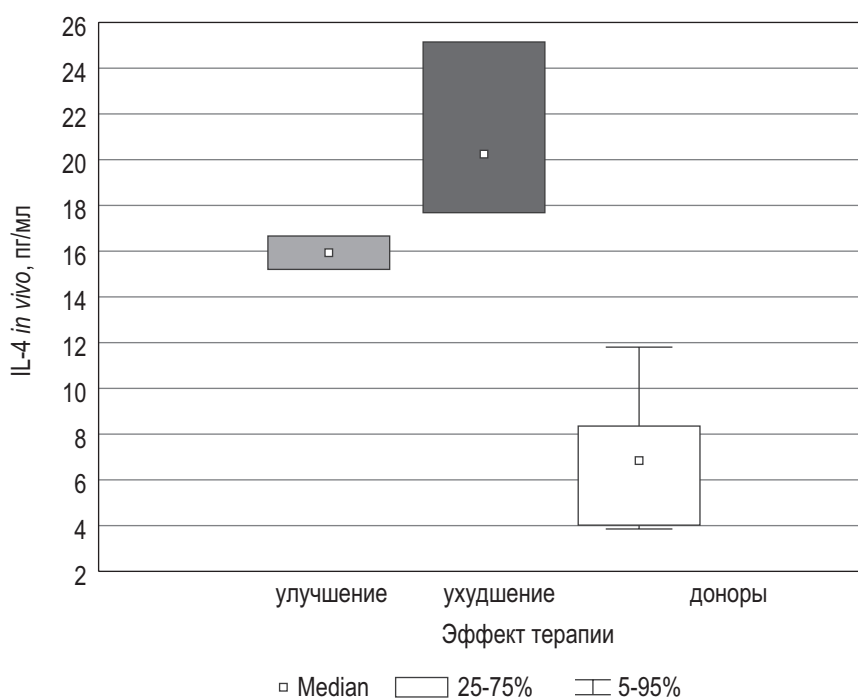


Рисунок 2. Уровень IL-4 крови у доноров и больных I и II групп до лечения

групп. Различия групп больных по величине данного показателя в точности соответствуют структуре различий при отсутствии стимуляции.

В отличие от IL-4, продукция IFN $\gamma$  в культуре МПК различается не только при стимуляции, но и при ее отсутствии. Можно отметить, что МПК у больных I группы с благоприятным течением заболевания отличаются практически в 2 раза большим накоплением IFN $\gamma$ , чем у больных с неадекватным ответом на терапию. При стимуляции можно отметить, что концентрация данного цитокина в культуре МПК у больных II группы практически не изменяется (+4%). Последнее может говорить о достигнутом пределе функциональных способностей клеток в отношении синтеза IFN $\gamma$ , тогда как в I группе показатель возрастает почти на треть (27%), свидетельствуя о сохранении потенциальной реактивности.

Полученные результаты позволяют предположить, что IgE, традиционно рассматривающийся как маркер активации аллергических реакций, может играть важную, в том числе регуляторную, роль в патогенезе других заболеваний внутренних органов.

Обнаружено, что концентрация IgE и в крови больных, и в спонтанной культуре МПК ни при поступлении, ни после окончания исследований достоверно не изменяется. Однако обращает на себя внимание, что в стимулированной культуре МПК после окончания лечения различия высоко достоверны ( $p < 0,005$ ). Кроме того, достоверны различия в абсолютном изменении концентрации IgE крови больных обеих групп в динамике наблюдения ( $p < 0,05$ ). Различия в концентрации IgE у больных I и II групп в стимулированной культуре МПК позволяет предположить наличие IgE-опосредованных механизмов регуляции иммунологического ответа при неблагоприятном течении заболевания.

Для объяснения полученных эффектов было предпринято изучение двух функционально антагонистических цитокина, участвующих в регуляции IgE — IL-4 и IFN $\gamma$ .

Нами зарегистрированы достоверные отличия концентраций IL-4 и IFN $\gamma$  в крови больных I и II групп. Эти отличия носят реципрокный характер. В крови лиц группы с благоприятным течением заболевания (I) концентрация IFN $\gamma$  достоверно выше, а концентрация IL-4, соответственно, ниже, чем в крови больных II группы. Известно, что данные цитокины являются функциональными антагонистами, что проявляется во взаимном торможении их физиологических эффектов, а также в разных направлениях сдвига дифференцировки наивных Th0. Принято считать, что сдвиг Th0 в сторону Th2 говорит об аллергическом характере воспаления, а Th1 —

о продуктивном воспалительном процессе. Сдвиг в направлении Th1 осуществляется под влиянием IL-4, тогда как медиатором, направляющим развитие наивных хелперов в направлении Th1 является IFN $\gamma$ . Таким образом, можно высказать предположение о развитии у II группы больных аллергического компонента воспалительного процесса [2]. Известно, что IL-4 является одним из главных регуляторов аллергических реакций и аллергического воспаления в тканях, так как помимо индукции синтеза IgE он является ростовым фактором для базофилов, тучных клеток и эозинофилов, попутно активируя их рецепторный аппарат. Это заключение подтверждается тем наблюдением, что при отсутствии достоверных различий между обследованными группами по величине IgE *in vivo* в результате проведенного лечения в I группе больных концентрация его достоверно снизилась ( $p < 0,01$ ), а во II группе — возросла ( $p < 0,05$ ).

Изучение культуральных свойств МПК больных обеих групп, показало, что в отсутствии стимуляции концентрации IL-4 различаются не достоверно ( $p > 0,10$ ), тогда как отличия IFN $\gamma$  высоко значимы ( $p < 0,01$ ). Отсутствие возрастания накопления IFN $\gamma$  в культуре МПК у больных II группы при стимуляции ФГА может свидетельствовать как об истощении механизмов активации синтеза IFN $\gamma$ , так и о выраженном сдвиге Th в сторону клеток, не продуцирующих этот цитокин, то есть Th2. Совершенно аналогичная, с точностью до «наоборот», ситуация с IL-4 в культуре МПК. Коэффициент стимуляции в I группе равен 1,04 ед, тогда как во II — 1,57 ед.

Возможно, объяснение этого факта кроется в особенностях механизмов стабильности клонов Th1 и Th2. Известно, что действие индукторов дифференцировки наивных Th0 в направлении Th2 доминирует над действием индукторов в направлении Th1 [2]. Кроме того, дифференцировка наивных Th0 в клон Th2 является необратимой, тогда как клон Th1 может регрессировать в Th2. Вероятно, такой результат исследований *in vitro* связан с отсутствием в культуральной среде дендритных клеток, являющихся основным продуцентом IL-12, запускающего каскад стимуляции синтеза клон Th1.

Таким образом, основываясь на результатах проведенного исследования можно предположить, что у больных с неблагоприятными результатами стандартной терапии острого нефрита в патогенезе заболевания имеют место компоненты IgE-зависимых регуляторных механизмов. Этот вывод может оказать существенное воздействие на понимание некоторых аспектов патогенеза данного заболевания и разработку более эффективных схем его терапии.



## Список литературы

1. Алиев Р.А. Роль этиологических и других факторов в развитии хронической почечной недостаточности. // Нефрол. и диализ.— 2001.— № 3.— С. 358-364.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: «Фолиант», 2008.— 552 с.
3. Калюжина Е.В., Гейниц О.А., Калюжин В.В., Пак Ю.Д. Состояние иммунного гемостаза у больных хронической почечной недостаточностью // Клиническая медицина. — 2006. — № 11. — С. 60-63.
4. Федичева Н.А., Ханферян Р.А. Особенности цитокиновой регуляции при обострении хронического нефрита у больных с благоприятным и неблагоприятным исходом лечения // Кубанский научный медицинский вестник. — 2009.— № 5.— С. 121-126.
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 в редакцию 02.02.2010*

*отправлена на доработку 12.02.2010*

*принята к печати 27.02.2010*