

УДК 616.61-002:612.017.1

**ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ
РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ОСТРОМ НЕФРИТЕ**

Федичева Наталья Александровна
*Городская клиническая больница скорой
медицинской помощи,
ГБОУ ВПО «Кубанский государственный
медицинский университет», Краснодар, Россия*

Горбов Леонид Валентинович
*Городская клиническая больница скорой
медицинской помощи,
ГБОУ ВПО «Кубанский государственный
медицинский университет», Краснодар, Россия*

В работе приведены результаты исследования у больных с благоприятным и неблагоприятным течением острого нефрита баланса IL-4 и IFN- γ , участвующих в направлении дифференцировки наивных Т-хелперов в направлении Th1 и Th2. Показано, что у больных с неадекватным ответом на терапию, вероятно, наблюдается дифференциация в направлении Th2, что приводит к развитию аллергического воспаления и накоплению *in vivo* и *in vitro* IgE.

Ключевые слова: ОСТРЫЙ НЕФРИТ,
ИНТЕРЛЕЙКИН-4, ИНТЕРФЕРОН- γ ,
АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ
ПРИ НЕАДЕКВАТНОМ ОТВЕТЕ НА ТЕРАПИЮ

UDC 616.61-002:612.017.1

**PECULARITIES OF CYTOKINE REGULATION
IN ACUTE NEPHRITIS**

Fedicheva Natal'ya Alexandrovna
*City clinic hospital of emergency care
SBEI Kuban state medical university,
Krasnodar, Russia*

Gorbov Leonid Valentinovich
*City clinic hospital of emergency care
SBEI Kuban state medical university,
Krasnodar, Russia*

The study presented the results of investigation of patients with favorable and unfavorable course of acute nephritis balance IL-4 and IFN- γ , that took part in differentiation of naive T-helpers to Th1 and Th2. It was shown that in patients with non-adequate response to therapy the differentiation toward Th2 was noted. It led to allergic inflammation and accumulation *in vivo* and *in vitro* IgE.

Key words: ACUTE NEPHRITIS, INTERLEUKINE-4, INTERFERONE- γ , ALLERGIC INFLAMMATION IN NON-ADEQUATE RESPONSE TO THERAPY

Острый нефрит является воспалительным заболеванием почек, имеющим в своем патогенезе выраженную аутоиммунную составляющую. Ткань почек синтезирует эритропоэтин, вследствие чего эритроидный росток кроветворения оказывается коммитированным при остром нефрите. У больных наблюдается снижение таких показателей красной крови, как количество эритроцитов и концентрация гемоглобина. В случае недостаточно активного лечения данное заболевание может подвергаться хронизации, и в дальнейшем приводить к хронической почечной недостаточности, в том числе требующей проведения программируемого гемодиализа.

Такие последствия объясняют не только значительный социальный эффект острого нефрита, но и важность выяснения иммунологических особенностей патогенеза данного заболевания у больных с различным его течением.

Значение иммуноглобулина E, интерлейкина-4 и интерферона- γ хорошо изучено в патогенезе таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит [Rambert J., Mamani-Matsuda M., Moynet D. et al., 2009] и системная красная волчанка [Biagini R.E., Smith J.P., Sammons D.L., Mackenzie B.A. and Parks C.G., 2008, p. 228; Atta A.M., Sousa C.P., Carvalho E.M. and Sousa-Atta M.L.B., 2004]. Однако вопросы цитокиновой регуляции при остром нефрите в настоящее время не получили должного освещения в иммунологической литературе. При исследовании образцов биоптатов ткани почек методом иммунофлюоресцентного анализа у 20 больных из 373 обследованных с различными формами нефрита (менее 6 %) были обнаружены следы IgE. При анализе концентрации IgE в сыворотке крови у больных с гломерулонефритом она не выходит за рамки нормальных значений, однако, всегда находится на верхней границе нормы [Robertson M.R., Potter E.V., Roberts M.L., Patterson R., 1999].

Данных об изучении продукции цитокинов в культуре мононуклеаров у больных с острым нефритом в доступной литературе нами не обнаружено.

Целью настоящей работы явилось изучение динамики концентрации иммуноглобулина Е (IgE) *in vivo*, а также спонтанной и стимулированной продукции IgE *in vitro* у больных с хорошим и неудовлетворительным результатом лечения. Кроме того, в этих группах больных изучали концентрацию интерлейкина-4 и интерферона- γ как *in vivo*, так и *in vitro* в момент поступления в стационар.

Материал и методы. В работе изучены показатели иммунитета 14 больных с острым нефритом, находящихся на лечении в краевом нефрологическом центре. Результат лечения определяли путем экспертной оценки лечащими врачами по совокупности клинических признаков. В I группу с удовлетворительными результатами лечения и во II группу с неадекватным ответом на терапию включили по 7 человек.

Всем больным при поступлении и при выписке проводили общий анализ крови на полуавтоматическом анализаторе Medonic-530. Концентрации всех изученных аналитов определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на реактивах фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск). У больных в динамике изучали концентрацию IgE в крови *in vivo* и *in vitro* – в инкубационной среде (спонтанную и стимулированную). Для выяснения возможных механизмов патогенеза неадекватного ответа на терапию при поступлении изучали концентрацию интерлейкина-4 (IL-4) и интерферона- γ (IFN- γ), а также *in vivo* и *in vitro* (в 3-суточной культуре).

Выделенные в асептических условиях мононуклеары в концентрации 2×10^6 /мл помещали в стерильную среду на 72 часа при температуре 37°C. Стимуляцию синтеза цитокинов и IgE при культивировании мононуклеаров *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°C до момента проведения анализа. Сыворотку при исследовании *in vivo* также подвергали замораживанию. От момента замораживания биоматериала до проведения определения концентрации исследуемых цитокинов проходило не более 60 дней.

Статистическое исследование осуществляли 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 (p_{25} ; p_{75}), где Me – медиана, p_{25} и p_{75} – 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 различались не достоверно ($p > 0,05$). В группе с хорошим результатом лечения содержание эритроцитов и концентрация гемоглобина составили $3,30$ ($3,20$; $4,50$) $\times 10^9/\text{л}$ и $111,0$ ($108,0$; $140,0$) $\text{г}/\text{л}$, тогда как в группе с неудовлетворительными результатами лечения – $3,70$ ($3,60$; $4,00$) $\times 10^9/\text{л}$ и $116,0$ ($110,0$; $124,0$) $\text{г}/\text{л}$, соответственно. Кроме того не было выявлено достоверных различий между изучаемыми группами по уровню IgE *in vivo* ($p > 0,05$), который составлял у больных I группы $272,4$ ($171,7$; $318,5$), а II группы – $280,2$ ($231,9$; $521,0$) $\text{ед}/\text{мл}$.

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 IgE_{sp} составила $0,05$ ($0,05$; $0,07$), а IgE_{st} – $0,06$ ($0,05$; $0,08$) $\text{ед}/\text{мл}$, а во II группе – $0,07$ ($0,03$; $0,11$) и $0,08$ ($0,07$; $0,12$) $\text{ед}/\text{мл}$, соответственно. Различия между спонтанным и

стимулированным уровнем синтеза IgE мононуклеарами в условиях *in vitro* достоверны для обеих групп больных ($p < 0,05$).

К моменту окончания лечения мы наблюдали достоверные отличия между группами по величине изучаемых показателей. На рисунке 1 показана динамика содержания эритроцитов крови у больных I и II групп в процессе лечения. В I группе медиана содержания эритроцитов выросла на 21 %, достоверно отличаясь в динамике от показателя при поступлении ($p < 0,05$) и увеличившись на $0,70 \times 10^9/\text{л}$, а во II группе – достоверно уменьшилась на 19 % ($p < 0,05$). Уменьшение медианы содержания эритроцитов во II группе составило $0,70 \times 10^9/\text{л}$. Различия в содержании эритроцитов между группами после окончания лечения по критерию Манна – Уитни также оказались достоверными ($p < 0,01$).

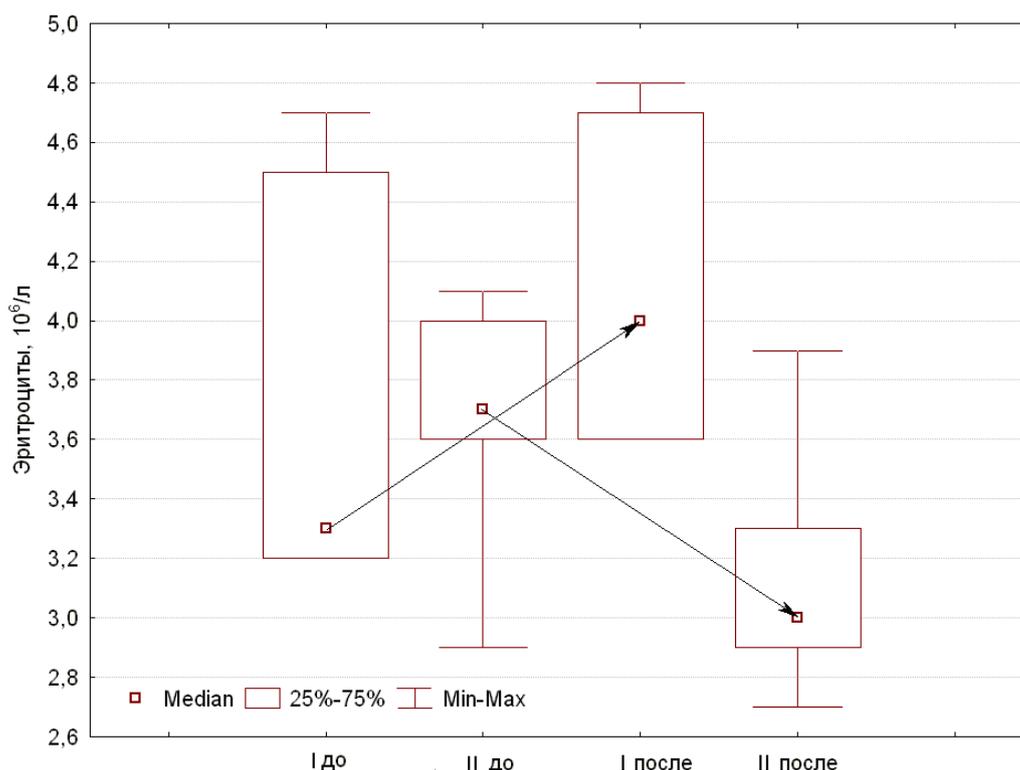


Рисунок 1. Динамика содержания эритроцитов крови у больных I и II групп с различным исходом заболевания. Стрелками указаны тренды динамики изучаемого показателя в ходе лечения

Подобные изменения имели место при анализе концентрации гемоглобина. В I группе больных медиана концентрации гемоглобина в

среднем достоверно выросла ($p < 0,05$) на 9 %, увеличившись на 10,0 г/л, в то время как во II группе медиана концентрации данного анализа достоверно снизилась на 20 % относительно уровня при поступлении ($p < 0,05$). При этом величина уменьшения медианы концентрации составила 23,0 г/л. Различия между группами после окончания лечения по критерию Манна – Уитни оказались высоко достоверны ($p < 0,01$).

Динамика концентрации IgE в крови больных исследуемых групп была противоположной (рис. 2).

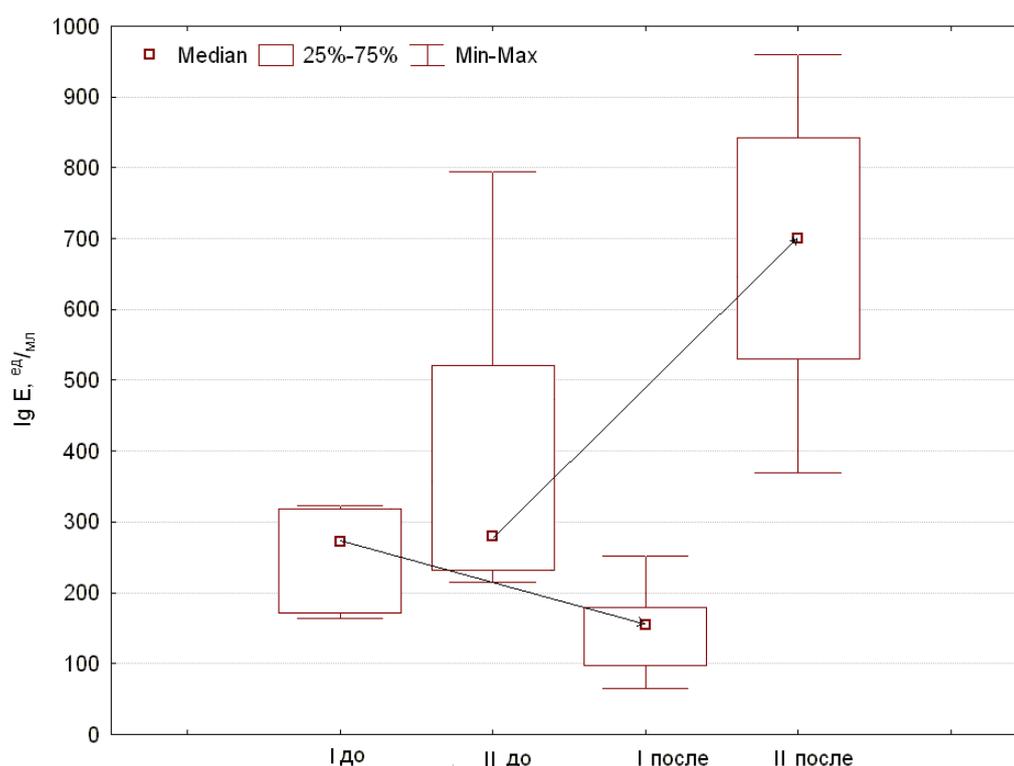


Рисунок 2. Динамика содержания IgE у больных I и II групп с различным исходом заболевания. Стрелками указаны тренды динамики изучаемого показателя в ходе лечения

В I группе больных с благоприятным течением заболевания концентрация этого анализа в динамике уменьшилась в среднем на 43 % ($p < 0,05$), тогда как во II группе имел место реципрокный процесс, и медиана концентрации IgE увеличилась на 150 % ($p < 0,05$). В I группе медиана изучаемого показателя уменьшилась на 118,0 ед/мл, тогда как во II – увеличилась на 420,5 ед/мл. Различия между концентрацией IgE у больных I

и II групп являются высоко достоверными ($p < 0,01$). Необходимо отметить, что абсолютная величина динамики концентрации изучаемого анализа имеет тенденцию к различию ($0,05 < p < 0,10$), то есть увеличение концентрации IgE во II группе имеет более выраженный характер, чем уменьшение данного показателя в I группе. Очевидно, это может свидетельствовать о большей интенсивности динамики иммунологического ответа при прогрессировании тяжести состояния, по сравнению с выздоравливающими больными.

Изучение синтеза IgE мононуклеарами *in vitro* после окончания лечения, так же как и при поступлении, показало отсутствие различий между группами и при наличии, и отсутствии фитогемагглютина в среде инкубации. Величина спонтанного синтеза IgE в I группе больных составила 0,06 (0,05; 0,06), а во II группе – 0,08 (0,05; 0,12) ед/мл ($p > 0,05$). Аналогично, стимулированный синтез IgE в группах составил 0,06 (0,05; 0,10) и 0,09 (0,08; 0,13) ед/мл ($p > 0,05$). Сравнение данных показателей в динамике также показало отсутствие различий в величине концентрации IgE при отсутствии стимулятора в культуральной среде у больных как I, так и II групп, а также при стимуляции ФГА у больных I группы ($p > 0,05$). В то же время динамика концентрации IgE *in vitro* у больных II группы была достоверна ($p = 0,05$).

Отсутствие различий в спонтанной и стимулированной продукции IgE *in vitro* в культурах мононуклеаров больных с острым нефритом при наличии выраженных изменений у этих же больных *in vivo* заставляет искать другие изменения в системе цитокинов, которые позволят объяснить динамику концентрации IgE у больных с благоприятным течением заболевания и с неадекватным ответом на терапию.

При поступлении (рис. 3) концентрация IL-4 в крови больных I группы составила 28,3 (21,5; 30,5), тогда как у больных II группы – 33,1 (31,4; 34,8) пг/мл ($p < 0,05$).

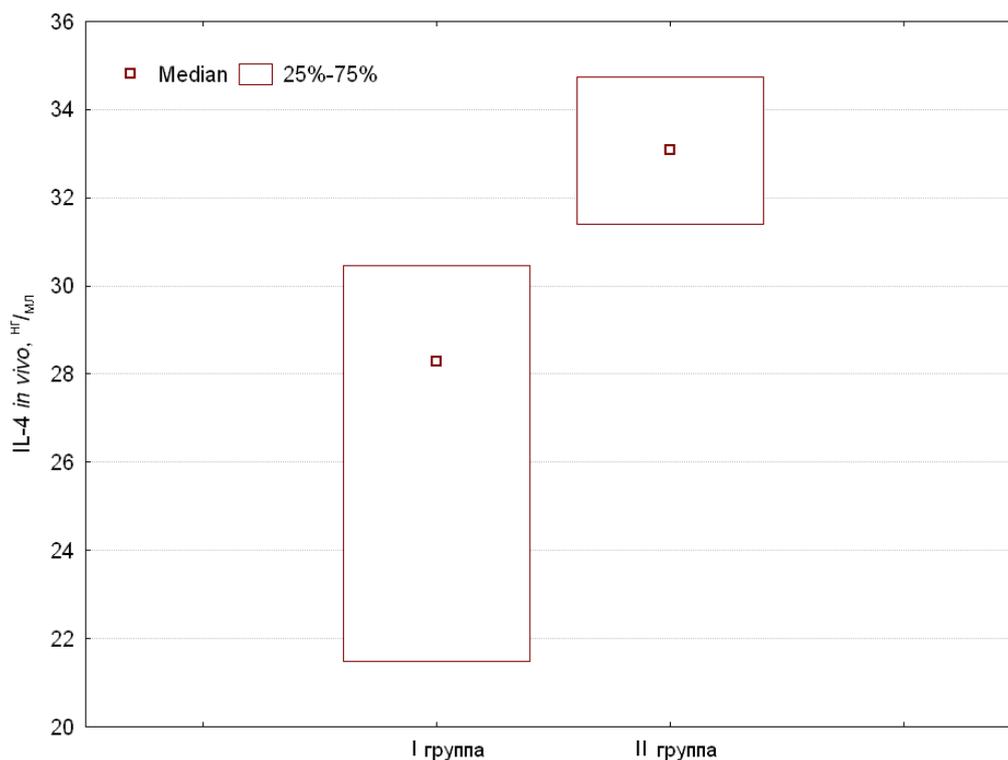


Рисунок 3. Содержание IL-4 в крови больных I и II групп при поступлении

Исследование культуральных свойств мононуклеаров показало (рис. 4), что *in vitro* в отсутствие стимуляции различия между группами недостоверны – в культуральной среде у I группы больных накапливается 3,45 (1,91; 4,25), а во II группе – 3,12 (2,31; 3,92) пг/мл IL-4 ($p > 0,10$). При стимулировании с помощью добавления ФГА соответствующие значения равны 5,08 (4,56; 5,51) и 5,65 (5,51; 5,69) пг/мл ($p < 0,05$).

Изучение концентрации γ -интерферона *in vivo* (рис. 5) показало, что у больных I группы при поступлении величина данного показателя составила 197,5 (178,7; 199,7), а у пациентов II группы – 132,0 (111,7; 152,2) пг/мл ($p < 0,05$). Исследование продукции данного цитокина *in vitro*, не выявило существенных различий между группами. При отсутствии стимуляции концентрация IFN- γ в культуральной среде в I группе составила 26,3 (23,6; 45,1), а во II – 48,8 (38,6; 58,9) пг/мл ($p > 0,05$).

Стимулированный синтез IFN- γ составил, соответственно, 47,9 (39,8; 59,9) и 62,3 (54,5; 70,1) пг/мл ($p > 0,05$).

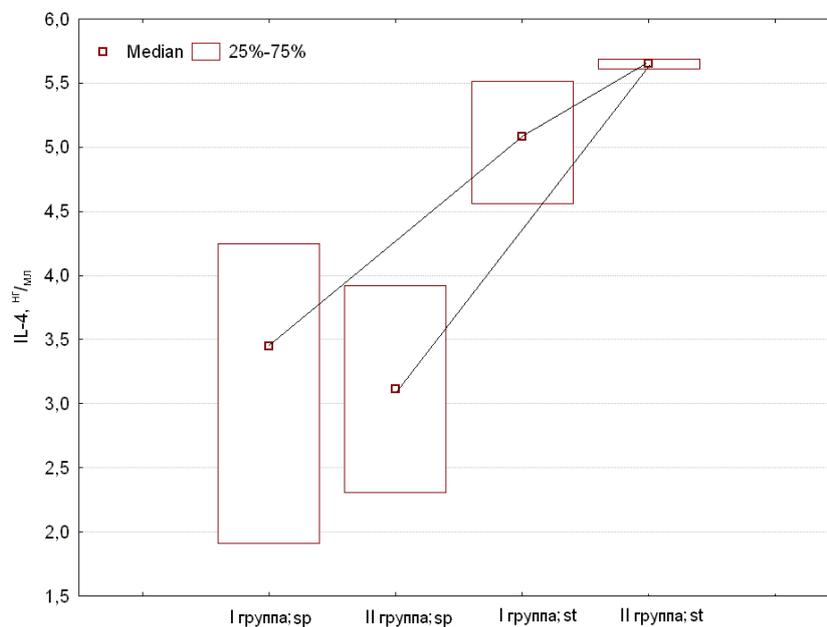


Рисунок 4. Содержание IL-4 в культуральной жидкости мононуклеаров больных I и II групп при поступлении, отсутствии стимуляции и наличии в культуральной среде ФГА. Линиями указаны достоверные отличия ($p < 0,05$)

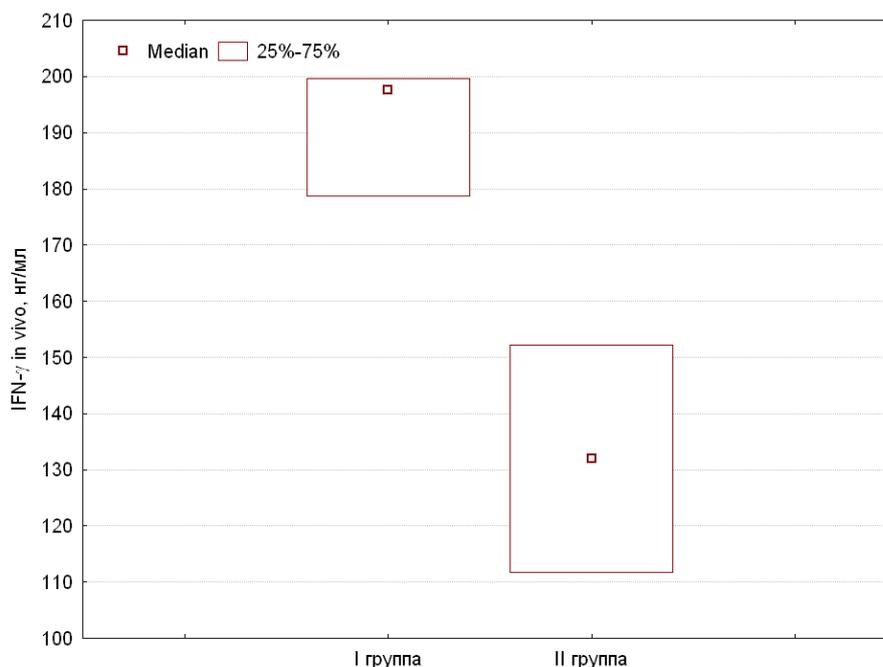


Рисунок 5. Содержание IFN- γ в крови больных I и II групп при поступлении

При анализе полученных результатов обращает на себя внимание реципрокный характер концентрации изученных цитокинов у больных I и II групп. В крови лиц из группы с благоприятным течением заболевания (I) концентрация IFN- γ достоверно выше, а концентрация IL-4, соответственно, ниже, чем в крови больных II группы. С учетом функционального антагонизма данных цитокинов, проявляющегося во взаимном торможении их физиологических эффектов, а также в том, что они сдвигают дифференцировку наивных Th₀ в направлении Th1 (IFN- γ) и Th2 (IL-4), можно говорить о том, что во II группе больных наблюдается развитие аллергического воспаления [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. 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 ($p < 0,05$), а во II группе – возросла ($p < 0,05$).

Изучение культур мононуклеаров, выделенных из крови больных обеих групп, показало, что в отсутствии стимуляции концентрации изученных цитокинов различаются не достоверно ($p > 0,05$). В то же время, при стимуляции ФГА *in vitro* концентрация IL-4 у больных I группы достоверно ниже ($p < 0,05$), чем у больных с неблагоприятным течением заболевания, тогда как различия в концентрации IFN- γ не достоверны ($p > 0,05$). 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 [Кетлинский С.А.,

Симбирцев А.С., 2008]. Кроме того, дифференцировка нативных 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 ИЛ-12, запускающего каскад стимуляции синтеза клона Th1.

Таким образом, результаты проведенного исследования убедительно показали у больных с неблагоприятными результатами стандартной терапии острого нефрита наличие в патогенезе заболевания компонентов аллергического воспаления, что может оказать существенное воздействие на разработку новых более эффективных схем терапии данного заболевания.

Список литературы

1. *Atta A.M., Sousa C.P., Carvalho E.M. and Sousa-Atta M.L.B.* Immunoglobulin E and systemic lupus erythematosus // *Braz. J. Med. Biol. Res.*, October 2004, Volume 37 (10). – p. 1497–1501.
2. *Biagini R.E., Smith J.P., Sammons D.L., Mackenzie B.A. and Parks C.G.* Elevated serum IgE concentrations in systemic lupus erythematosus are related to history of childhood allergy, asthma, and hives // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 121, Issue 2, Supplement 1, February 2008, p. 228.
3. *Rambert J., Mamani-Matsuda M., Moynet D. et al.* Molecular blocking of CD23 supports its role in the pathogenesis of arthritis // *PLoS ONE*. – 2009. – № 1. – p. 4834.
4. *Robertson M.R., Potter E.V., Roberts M.L., Patterson R.* Immunoglobulin E in renal disease // *Nephron*. – 1999. – № 16. – p. 256–271.
5. *Кетлинский С.А., Симбирцев А.С.* Цитокины. – СПб.: «Фолиант», 2008. – 552 с.