

НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО И ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ С ПОЧЕЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

**И.А. ЮШИНА¹,
Е.В. КАЛМЫКОВА¹,
Е.В. НЕКИПЕЛОВА²
М.И. ЧУРНОСОВ¹**

¹Белгородский
государственный
университет

e-mail: yushina@bsu.edu.ru

²Белгородская областная
клиническая больница
Святителя Иосафа

Приведены результаты исследования гуморального иммунитета у больных хроническим гломерулонефритом на основании данных об уровнях IgA, IgG, IgM. Выявлены значительные нарушения гуморального звена иммунитета – высокое содержание IgA и IgG у больных хроническим гломерулонефритом, которые зависят от клинической группы ХГН и уровня протеинурии. Клинические варианты ХГН на концентрацию иммуноглобулинов у больных ХГН не влияют. Методами кластерного и факторного анализов показана значимая дифференциация групп больных ХГН, получающих заместительную терапию и с аллотрансплантантом почки, а также пациентов с высокой протеинурией от других групп больных и контрольной группы. Изучено распределение частот аллелей и генотипов генов фактора некроза опухоли α , рецептора фактора некроза опухоли 1 типа, лимфотоксина α , трансформирующего фактора роста β и интерлейкина 1В у больных ХГН. Наличие у больных ХГН аллелей с провоспалительным и фибропластическим эффектом ассоциировано с развитием умеренной или выраженной протеинурии.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, хроническая почечная недостаточность, иммуноглобулины, полиморфизм генов цитокинов.

В настоящее время распространённость заболеваний почек имеет прогрессивный рост. Согласно данным World Health Report Global Burden Disease (GBD), project патология почек и мочевых путей ежегодно приводит к смерти примерно 850000 человек и обеспечивают 15010167 случаев утраты трудоспособности [1]. В исследовании NHANES, было продемонстрировано, что распространённость патологии почек достигает 5% в общей популяции. Хронический гломерулонефрит (ХГН) занимает ведущее место в составе почечной патологии и является одним из наиболее тяжёлых заболеваний почек. ХГН – заболевание характеризующиеся неуклонным прогрессированием, начавшись, процесс постепенно приводит к склерозированию почечной ткани. Случаи выздоровления больных при этом заболевании казуистически редки. Очевидно, что это самый частый вид патологического процесса, который является одной из распространённых причин хронической почечной недостаточности (ХПН), для лечения которой необходимы гемодиализ и пересадка почки [2]. Распространённость и заболеваемость терминальными стадиями хронической болезни почек неуклонно увеличивается в разных регионах мира [3]. Согласно экспериментальным и клиническим данным, существенный вклад в развитие ХГН вносят цитокины и факторы роста [4]. В развитии воспаления важную роль играет фактор некроза опухоли – мощный провоспалительный цитокин, который в свою очередь влияет на синтез макрофагами других хемокинов, важнейшими из которых являются интерлейкин 1 и его рецепторы. Известно, что определенные мутации в генах, кодирующих соответствующие хемокины, значительно изменяют уровень их экспрессии, что может влиять на течение хронического воспалительного процесса [5]. При этом следует отметить важную роль иммуноглобулинов в развитии иммуновоспалительных процессов в почках.

Целью нашей работы стало изучение полиморфизма генов цитокинов и содержания иммуноглобулинов у больных хроническим гломерулонефритом.

Группу исследования составили 370 человек: 202 больных хроническим гломерулонефритом и 168 человек популяционного контроля. В выборки больных и популяционного контроля включались индивидуумы русской национальности, являющиеся



уроженцами Белгородской области и не имеющие родства между собой. Клинико-лабораторные обследование и формирование выборки больных проводилось на базе отделения нефрологии областной клинической больницы. Больные ХГН были распределены в 4 клинические группы В 1 группе ретроспективно проанализировано течение различных форм ХГН в стадии клинико-лабораторной ремиссии (n=63). 2-я группа состояла из больных ХГН с разной степенью активности процесса (n=49). 3-я группа включала пациентов с терминальной ХПН (ТХПН) (n=44). 4-я группа состояла из больных с донорской почкой (n=8). В зависимости от клинического варианта ХГН, больные распределились следующим образом: латентный ГН (n= 35), нефротический ГН (n= 25), гипертонический (n=40), смешанный (n=42), гематурический (n=22). Среди пациентов наблюдались следующие морфологические формы ХГН: мезангиопролиферативный (МзПГН) (n=19), фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) (n=8) мезангиокапиллярный (МКГН) (n=4), мембранозный (МГН) (n=3). По степени протеинурии (ПУ) больных ХГН разделили в 3 группы. 1-я группа ПУ до 0,5г/л сут (n=70), 2-я группа ПУ до 3,5 г/л сут (n =59), 3-я группа ПУ более 3,5 г/л сут (n=35).

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови производили в вакуумные пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (рН=8.0) (для генетических исследований) и без консервантов (для иммунологических исследований).

Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции [6].

Анализ локусов TNF α -308G/A, TNFR1 -36A/G, Lta -250G/A, TGF β 1-869T/C, IL-1B-511C/T осуществлялся методом **полимеразной цепной реакции** (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась на амплификаторе «Терцик-МС4» производства компании «ДНК-технология» с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М» и олигонуклеотидных праймеров, синтезированных фирмой «Синтол» (табл. 1).

Таблица 1

Структура праймеров и ферменты рестрикции, используемые для генотипирования ДНК-маркеров методами ПЦР

Ген	Полиморфизм	Структура праймеров	Температура отжига	Фермент рестрикции	Литература
TNF α	-308G/A	F: 5'-aggcaataggtttgaggccat-3' R: 5'-tctccctgctccgattcgg-3'	60°C	Bsp19 I	[7]
TNFR1	-36A/G	F: 5'-gagcccaaatggggagtgagagg-3' R: 5'-accagccccggcaggagagg-3'	60°C	MspA1 I	[7]
Lta	-250G/A	F: 5'-ccgtgcttcgtgctttggacta-3' R: 5'-agaggggtggatgcttgggttc-3'	68°C	Bsp 19I	[8]
TGF β 1	-869T/C	F: 5'-ttccctcagagccctccta-3' R: 5'-gccgcagcttggacaggatc-3'	62°C	MspA1 I	[9]
IL-1B	-511C/T	F: 5'- tggcattgatctggttcac -3' R: 5'- gtttaggatcttcccact -3'	55°C	AvaI	[10]

Генотипирование ДНК-маркеров производилось методом анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома с использованием соответствующих ферментов рестрикции производства ООО "Сибэнзим" (Новосибирск) (табл. 2). После инкубации ре-



стрикционной смеси в течение 16 часов при температуре 37°C проводили разделение фрагментов ДНК с помощью вертикального или горизонтального электрофореза на электрофоретических ячейках, производства фирмы «Хеликон» (Россия).

Таблица 2

Распределение полиморфных маркеров генов цитокинов среди больных ХГН и в популяционном контроле, %

Локус, полиморфизм	Аллели, генотипы, генетическое разнообразие	Популяционный контроль (n=168)	Больные ХГН (n=202)	Критерии различий χ^2 (p)/OR(95%CI)
		%	%	
TNFa-308	TNF*1	88,36	83,75	0,37 (p>0,05)
	TNF*2	11,64	16,25	
	TNF1/TNF1	78,61	73,00	0,76 (0,38-1,53)
	TNF1/TNF2	19,50	21,50	1,13 (0,54-2,35)
	TNF2/TNF2	1,89	5,50	3,13 (0,55-23,00)
	H _o	0,19	0,21	
	H _e	0,21	0,27	
Lta-250	Lt*1	30,95	27,92	0,09 (p>0,05)
	Lt*2	69,05	72,08	
	Lt1/Lt1	8,93	9,14	1,00 (0,35-2,90)
	Lt1/Lt2	44,05	37,56	0,78 (0,43-1,43)
	Lt2/Lt2	47,02	53,30	1,27 (0,70-2,30)
	H _o	0,44	0,38	
	H _e	0,43	0,40	
TNFR1	A	45,52	54,29	1,28 (p>0,05)
	G	54,48	45,71	
	AA	22,76	35,35*	1,80 (0,93-3,52)
	AG	45,52	37,88	0,72 (0,39-1,31)
	GG	31,72	26,77	0,79 (0,41-1,51)
	H _o	0,46	0,38	
	H _e	0,49	0,49	
TGFβ1-869	T	61,66	57,04	0,33 (p>0,05)
	C	38,34	42,96	
	TT	35,58	34,17	0,92 (0,48-1,71)
	TC	52,15	45,73	1,18 (0,65-2,14)
	CC	12,27	20,10	1,83 (0,79-4,29)
	H _o	0,52	0,45	
	H _e	0,47	0,49	
IL-1B-511	C	35,27	33,84	0,93 (p>0,05)
	T	64,73	66,16	
	CC	8,30	12,22	1,54 (0,81-2,94)
	CT	53,94	43,23	0,65 (0,44-0,95)
	TT	37,76	44,55	1,32 (0,90-1,95)
	H _o	0,53	0,43	
	H _e	0,46	0,45	

Примечание: H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность; в скобках указаны объемы выборок; * – отклонение от равновесия Харди-Вайнберга среди больных ХГН (p<0,01).

В зависимости от размера разделяемых фрагментов ДНК использовали агарозный гель 2-3% концентрации, приготовленный на основе ТВЕ-буфера, окрашенный раствором бромистого этидия (0,01%). Визуализация фореграмм осуществлялась в темном боксе с трансиллюминатором фирмы UVP (Швеция).

Фрагменты длиной 107 п.н. соответствовали аллелю TNF*2 гена фактора некроза опухоли α, 87 и 20 п.н. – TNF*1, а 107, 87 и 20 п.н. выявлены у гетерозигот TNF*1/TNF*2. Фрагменты длиной 183 п.н. соответствовали аллелю А гена рецептора фактора некроза опухоли 1 типа, 108 и 75 п.н. – аллелю G, фрагменты длиной 183, 108 и 75 п.н. наблюдались у гетерозигот AG. Фрагменты длиной 782 п.н. соответствовали



аллелю Lt*2 гена лимфотоксина α , 586 и 196 п.н. – аллелю Lt*1, фрагменты длиной 782, 586 и 196 п.н. наблюдались у гетерозигот Lt*1/Lt*2. Фрагменты длиной 161, 67, 40 и 26 п.н. соответствовали аллелю T гена трансформирующего фактора роста $\beta 1$, 149, 67, 40, 26, 12 п.н. – аллелю C, фрагменты длиной 161, 149, 67, 40, 26 и 12 п.н. наблюдались у гетерозигот TC.

Фрагменты длиной 304 п.н. соответствовали аллелю T гена интеллейкина 1B, 114 и 190 п.н. – аллелю C, а 304, 114 и 190 п.н. выявлены у гетерозигот CT. Аллели TNF*2 гена фактора некроза опухоли α , аллель A гена, аллель Lt*1 гена лимфотоксина α , аллель T гена интеллейкина 1B повышают уровень секреции соответствующих цитокинов, что может обуславливать их более выраженные медико-биологические эффекты (противоспалительные и др.). Аллель C гена трансформирующего фактора роста $\beta 1$ обладает фибропластическим эффектом.

Уровень иммуноглобулинов A, M, G определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в образцах сыворотки крови со стандартными наборами в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы «Statistika 6.0», которая включала основную статистику факторный и кластерный анализ.

Об ассоциации аллелей и генотипов с предрасположенностью к развитию хронической почечной недостаточности при хроническом гломерулонефрите судили по величине отношения шансов (OR) [11] – показателю, отражающему, во сколько раз вероятность оказаться в группе «случай» (больные с ХГН) отличается от вероятности оказаться в группе «контроль» (здоровые) для носителя изучаемого генотипа (аллеля): $OR = (A/B)/(C/D)$, где A и B – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный аллель или генотип, соответственно; D и C – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный аллель или генотип, соответственно. $OR > 1$ рассматривали как положительную ассоциацию заболевания с исследуемым генотипом или аллелем (фактор риска) и $OR < 1$ – как отрицательную ассоциацию (фактор устойчивости). Границы 95% доверительного интервала (CI) для OR вычисляли по формулам [11]:

$$OR_{\min} = OR^{(1-1,96\sqrt{\chi^2})} \quad \text{и} \quad OR_{\max} = OR^{(1+1,96\sqrt{\chi^2})}$$

При изучении распределения частот генотипов рассматриваемых полиморфных генетических систем среди больных ХГН и в популяционном контроле выявлено, что для большинства из них выполняется равновесие Харди-Вайнберга. Выявлена значительная вариабельность аллельного разнообразия по исследованным локусам среди населения Белгородской области: показатель наблюдаемой гетерозиготности варьировал от $H_0 = 0,19-0,21$ (для TNF α -308) до $H_0 = 0,45-0,52$ (для TGF $\beta 1$ -869), что соответствует литературным данным по другим популяциям [12, 13].

Сравнительный анализ частот генов и генотипов полиморфных локусов фактора некроза опухоли α , лимфотоксина α , рецептора фактора некроза опухоли 1 типа, трансформирующего фактора роста $\beta 1$ и интерлейкина 1B между больными ХГН и популяционным контролем не выявил достоверных различий (табл. 2). Эти данные могут свидетельствовать о том, что рассмотренные нами цитокины не являются этиологическими факторами хронического гломерулонефрита, что полностью согласуется с современными представлениями о функциональной роли данных цитокинов. Они, являясь медиаторами межклеточных коммуникаций при иммунном ответе, развитии воспалительных реакций и фибропластических процессах, эффекторами некоторых реакций иммунитета [14, 15] априорно в соответствии с медико-биологической логикой, а также согласно литературным материалам [16, 17] будут играть важное значение не в этиологии, а в патогенезе хронического гломерулонефрита.

При изучении распределения генов и генотипов изучаемых полиморфных генетических систем в группах больных ХГН с разным уровнем протеинурии (незначительная протеинурия – до 1 г/сут, умеренная – 1-3 г/сут, выраженная – более 3 г/сут) (табл. 3) установлены следующие особенности. Во-первых, пациенты с умеренной про-



теинурией (1-3 г/сут) характеризуются наибольшими частотами провоспалительного аллеля TNF*2 и его генотипов (TNF2/TNF2, TNF1/TNF2) гена фактора некроза опухоли (TNF α -308) и провоспалительного аллеля Lt*1 и его генотипов (Lt1/Lt1, Lt1/Lt2) гена лимфотоксина α (Lta-250) по сравнению с больными с незначительной протеинурией ($p < 0,01-0,001$).

Таблица 3

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов TNF α -308, Lta-250, TNFR1 и TGF β 1-869 у больных ХГН в зависимости от степени протеинурии, %

Гены	Аллели, генотипы	Уровень протеинурии		
		<1 г/сут	1-3 г/сут	>3 г/сут
TNF α -308	Аллель TNF*1	85,71	72,22	91,67
	Аллель TNF*2	14,29	27,78**	8,33
	Генотип TNF1/TNF1	80,96	55,56	83,33
	Генотипы TNF1/TNF2, TNF2/TNF2	19,04	44,44****	16,67
Lta-250	Аллель Lta*1	19,05	41,67****	16,67
	Аллель Lta*2	80,95	58,33	83,33
	Генотипы Lta1/Lat1, Lta1/Lta2	33,33	55,56****	33,33
	Генотип Lta2/Lta2	66,67	44,44	66,67
TNFR1	Аллель TNFR1*A	47,50	38,89	63,89*
	Аллель TNFR1*G	52,50	64,11	36,11
	Генотипы AA, AG	60,00	66,67	83,33****
	Генотип GG	40,00	33,33	16,67
TGF β 1-869	Аллель TGF*T	67,50	66,67	52,78
	Аллель TGF*C	32,50	33,33	47,22*
	Генотип TT	40,00	44,44	38,89
	Генотипы TC, CC	60,00	55,56	61,11
IL-1B-511	Аллель IL-1B*C	33,59	26,56	31,25
	Аллель IL-1B*T	66,41	73,44	68,75
	Генотип TT	16,36	6,67	14,29
	Генотипы TC, CC	83,64	93,33	85,71

* – различия достоверны между больными с умеренной или выраженной протеинурией и больными с незначительной протеинурией (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,001$).

Во-вторых, пациенты с выраженной протеинурией (более 3 г/сут) имеют максимальную распространенность как провоспалительного аллеля TNFR1*A и его генотипов (AA, AG) гена рецептора фактора опухоли (TNFR1), так и фибропластического аллеля TGF β 1*C гена трансформирующего фактора роста β 1 (TGF β 1-869) в сравнении с больными с незначительной протеинурией ($p < 0,05-0,001$).

Проведенное изучение уровней иммуноглобулинов показало (табл. 4), что у больных ХГН наблюдается более высокое содержание иммуноглобулинов А (3,75 г/л) и G (18,85 г/л) по сравнению с контрольной группой (2,98 г/л и 12,42 г/л, соответст-

венно, $p < 0,001$). Уровень иммуноглобулина М у больных и в контроле оказался одинаков ($p > 0,05$).

Таблица 4

**Уровень иммуноглобулинов А, М, G у больных ХГН
и в контрольной группе, г/л**

Иммуноглобулины	Больные ХГН (n=164)	Контроль (n=62)	P
Ig A	3,75±14	2,98±0,15	P<0,001
IgM	2,81±0,09	2,80±0,14	P<0,05
IgG	18.85± 0,56	12,42±0,73	P<0,001

Сравнительный анализ уровней иммуноглобулинов у больных ХГН различных клинических групп (стадия ремиссии; активный процесс; терминальная почечная недостаточность; больные с аллотрансплантантом почки) (табл.5) установил, что содержание IgA и IgG среди больных ХГН всех анализируемых клинических групп достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,005-0,001$). При этом, максимальный уровень как IgA (4,44г/л), так IgG (21,49 г/л) характерен для больных с донорской почкой. Эти данные свидетельствуют о выраженных нарушениях в гуморальном звене иммунитета у больных ХГН с почечным аллотрансплантантом.

Следует отметить, что больные ХГН, получавшие заместительную терапию, наряду с высоким уровнем IgA (4,05 г/л) имеют значительно более низкое содержание IgG (15,34 г/л), чем больные ХГН других клинических групп (18,92-21,49г/л, $p < 0,01-0,001$) и существенно сниженный уровень IgM (2,22г/л), как в сравнении с пациентами других клинических групп (2,95-3,13 г/л, $p < 0,05-0,01$), так и с контролем (2.80 г/л, $p < 0.01$). Содержание Ig M у больных ХГН, относящихся к разным клиническим группам (за исключением пациентов с терминальной почечной недостаточностью), не отличается от показателей контрольной группы ($p > 0,05$).

Таблица 5

**Уровни иммуноглобулинов А, М, G в зависимости от клинических
групп у больных ХГН, в г/л**

Клинические группы	N	IgA	IgM	IgG
1. Группа (больные ХГН в ст. ремиссии)	63	3,62±0,22*	2,95±0,14	20,92±0,94***
2. Группа (больные ХГН в ст. обострения)	49	3,53±0,23*	3,13± 0,19	18,92±1,04***
3.Группа (больные с ХГН с ТХПН)	44	4,05±0,24***	2,22±0,09**	15,3±40,72**
4. Группа (больные с донорской почкой)	8	4,44± 0,53**	2,98±0,28	21,49±3,35***
5. Контрольная группа	62	2,98±0,15	2.80±0,15	12,4±20,74

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
(сравнение групп больных с контролем)

Результаты проведенного факторного анализа полностью подтверждают данные сравнительного анализа. При факторном анализе, выполненного по методу главных компонент, выделено два значимых фактора с суммарным вкладом в общую дисперсию признака 97,13% (вклад первого фактора – 57,93%, второго – 39,25%). На рис. 1 представлено графическое изображение рассматриваемых клинических групп больных в пространстве двух главных факторов. Согласно рис. 1 группа больных получающих заместительную терапию по содержанию иммуноглобулинов существенно отличается, как от пациентов других клинических групп, так и от контроля. При этом наибольшие отличия в концентрации иммуноглобулинов наблюдаются между группой больных с донорской почкой и контрольной группой.

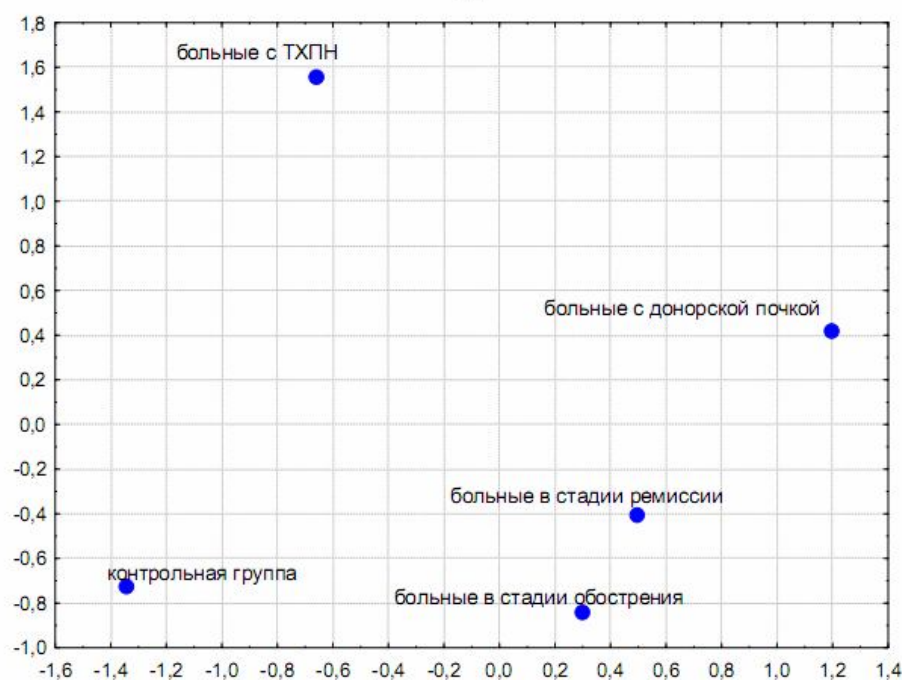


Рис. 1. Расположение в пространстве двух главных факторов различных клинических групп больных ХГН

При сравнительном исследовании концентраций иммуноглобулинов у больных с различными клиническими вариантами ХГН: латентный, нефротический, гипертонический, смешанный, гематурический (табл. 6) достоверных различий между ними по содержанию IgA, IgM, IgG не выявлено. Следует подчеркнуть, что у всех анализируемых нами групп пациентов с различными клиническими вариантами ХГН наблюдаются высокие уровни IgA (3,50-3,78 г/л) и IgG (17,34-21,06 г/л) и отсутствие отклонений в содержании IgM по сравнению с контрольной группой. Анализ соотношений групп пациентов с различными клиническими вариантами ХГН, проведённый с использованием кластерного анализа показал следующее (рис. 2). Во-первых, все анализируемые группы больных в зависимости от их клинических вариантов по уровню рассматриваемых иммуноглобулинов объединяются в один суперкластер, который чётко дифференцируется от контрольной группы. Во-вторых, в рамках данного суперкластера выделяются два субкластера, первый из которых представлен больными латентным и нефротическим вариантами ХГН, второй – пациентами с гипертоническим и смешанным клиническими вариантами ХГН.

Таблица 6

Уровень иммуноглобулинов в зависимости от клинических вариантов ХГН, в г/л

Клинические варианты ХГН	N	IgA	IgM	IgG
1. Латентный ХГН	35	3,75±0,17*	2,63±0,17	17,34±1,08***
2. Нефротический ХГН	25	3,78±0,27**	3,11±0,27	17,82±1,54***
3. Гипертонический ХГН	40	3,50±0,18*	2,85±0,18	19,02±1,12***
4. Смешанный ХГН	42	3,69±0,15*	2,72±0,15	18,79±0,96***
5. Гематурический ХГН	22	3,72±0,25*	2,98±0,25	21,06±1,66***
6. Контрольная группа	62	2,98±0,15	2,80±0,15	12,42±0,74

Примечание: *p<0,05; ** – p<0,001; *** – p<0,001 (сравнение групп больных с контролем).

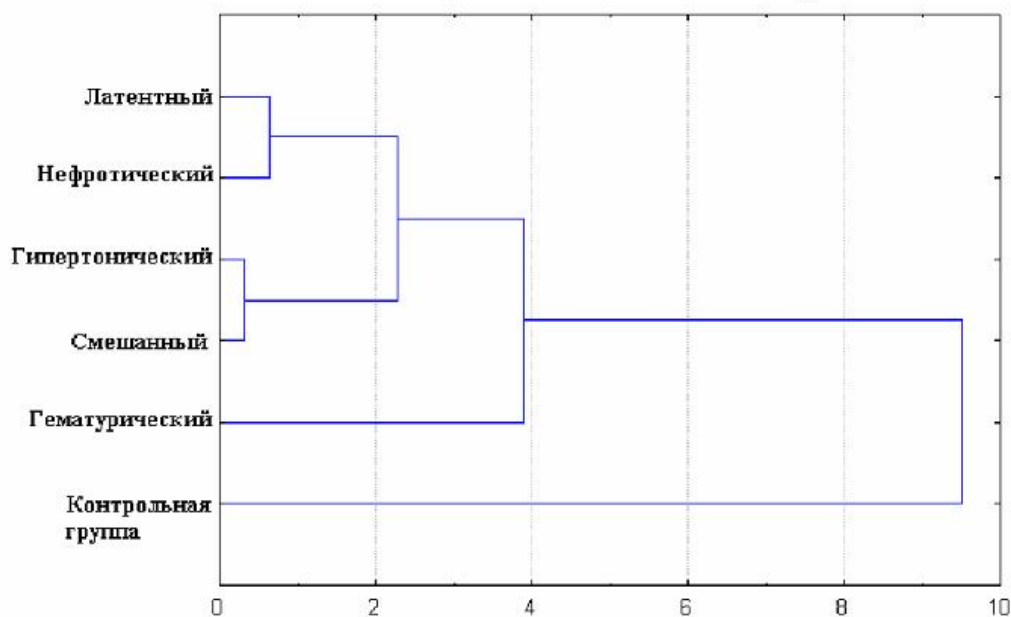


Рис. 2. Дендрограмма соотношений группы больных с различными клиническими вариантами ХГН (построена методом Уорда по содержанию иммуноглобулинов)

Исследование уровня иммуноглобулинов среди групп больных ХГН с различной степенью протеинурии (табл. 7) показало, что все рассмотренные группы больных с различной степенью протеинурии, как и в целом больные ХГН, имеют более высокие показатели IgA (3,48-3,98г/л) и IgG (18,30-20,31г/л), чем в контроле (2,98г/л и 12,42г/л,соответственно, $p < 0,05-0,001$), а уровень IgM у них (2,68-3,22 г/л) не отличается от данных контрольной группы (2,80г/л, $p > 0,05$).

Таблица 7

Сравнительный анализ уровней иммуноглобулинов в зависимости от степени протеинурии у больных ХГН, в г/л

Степень протеинурии	N	IgA	IgM	IgG
ПУ до 0,5г/сут.	70	3,72±0,21**	2,69±0,24	19,28±0,83****
ПУ до 3,5г/сут.	59	3,90±0,24**	2,68±0,15	18,30±0,93***
ПУ более 3,5г/сут.	35	3,48±0,36*	3,22±0,22	20,31±1,49****
Контрольная группа	62	2,98±0,15	2,80±0,15	12,42±0,74

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$
(сравнение групп больных с контролем)

Выявленные при сравнительном анализе отличия по содержанию двух из трёх анализируемых иммуноглобулинов между больными с различным уровнем протеинурии и контрольной группой подтверждаются и данными кластерного анализа. Дендрограмма, построенная методом Уорда на основе евклидовых расстояний (рис 3), свидетельствует о чёткой дифференциации групп пациентов с разным уровнем протеинурии и контрольной группы.

При проведении факторного анализа по методу главных компонент выделено два значимых фактора. Их суммарный вклад в общую дисперсию признака составляет 98,84%, в том числе вклад первого фактора равен 59,31%, второго-39,53%.

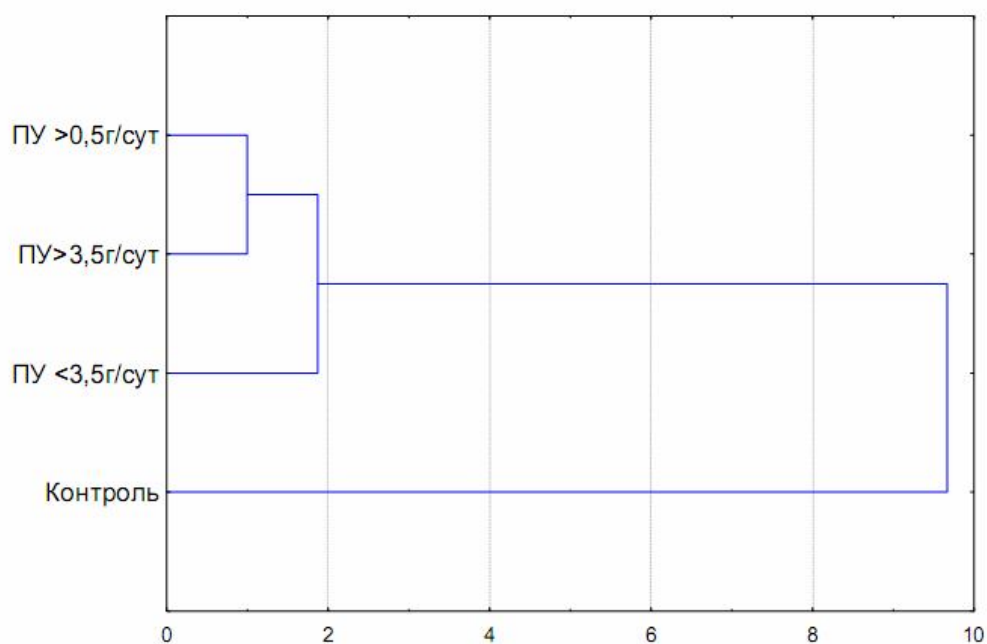


Рис.3 Дендрограмма соотношений групп больных с разной степенью протеинурии (построена методом Уорда по содержанию иммуноглобулинов)

Графическое изображение расположения в пространстве двух главных факторов изученных групп больных с разным уровнем протеинурии и контрольной группы представлено на рис. 4.

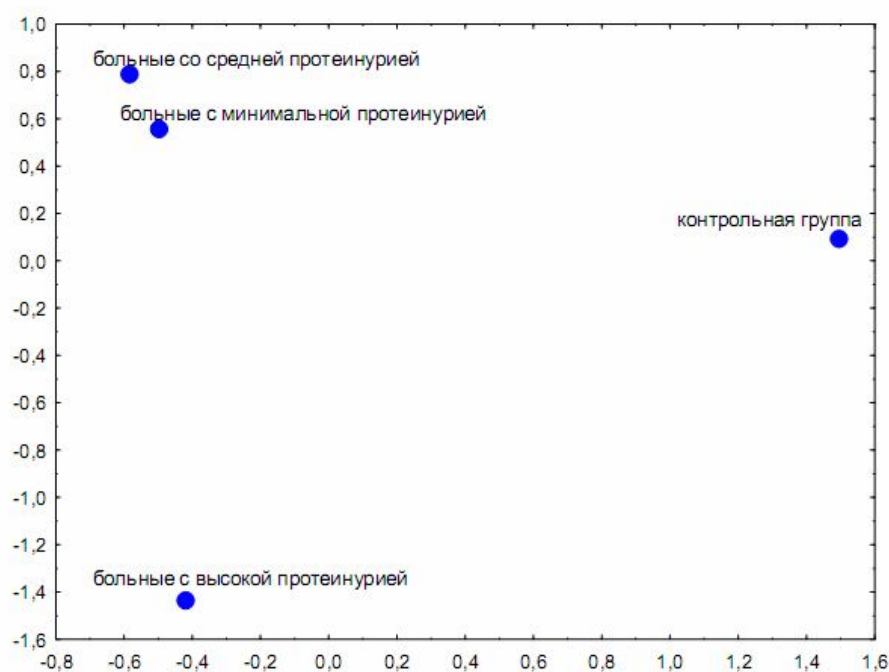


Рис. 4. Расположение в пространстве двух главных факторов групп больных ХГН в зависимости от степени протеинурии

Анализ рис 4 позволяет установить, что, во-первых, контрольная группа существенно отличается по содержанию иммуноглобулинов от изученных групп больных. Во-



вторых, группы больных с небольшим и средним уровнем протеинурии наиболее близки по содержанию рассматриваемых иммуноглобулинов. В-третьих, пациенты с высоким уровнем протеинурии по концентрации иммуноглобулинов имеют значительные отличия, как от контрольной группы, так и от группы больных с минимальным и средним уровнем протеинурии.

Таким образом, нами изучено распределение частот аллелей и генотипов генов фактора некроза опухоли α , рецептора фактора некроза опухоли 1 типа, трансформирующего фактора роста β и интерлейкина 9 у больных ХГН. Наличие у больных ХГН провоспалительных аллелей генов TNF α -308, Lta-250, TNFR1 и фибропластического аллеля гена TGF β 1-869 ассоциировано с развитием умеренной или выраженной протеинурии.

Больные ХГН имеют значительные нарушения гуморального звена иммунитета – высокое содержание IgA и IgG, степень выраженности которых зависит от клинической группы ХГН и уровня протеинурии. Результаты сравнительного анализа подтверждаются данными кластерного и факторного анализа. Клинические варианты ХГН на концентрацию иммуноглобулинов у больных ХГН не влияют.

Литература

1. Locatelli F, Del Vecchio L, Pozzoni P. The importance of early detection of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 [Suppl 98] : 2-7.
2. Мухин Н.И., Тареева И.Е., Шилов Г.Л. Диагностика и лечение болезней почек. – М.: ТЕОТАР-МЕД, 2002. – 383 с.
3. Nikolas T.L. Awareness of kidney disease in the US population: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 to 2000. *Am. J. Kidney Dis.* – 2004. – Vol.44. – P.185-197.
4. Вашурина Т.В., Сергеева Т.В. Цитокины и адгезивные молекулы в патогенезе хронического гломерулонефрита // *Нефрология и диализ.* – 2002. – №4. – С.232-239.
5. Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология // *Цитокины и воспаление.* – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 4-10
6. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA//*Methods in Molecular Biology*/Ed. Walker J.M.N.Y.: Human Press. – 1984. – V.2. – P. 31-34.
7. Hulkkonen J. Inflammatory Cytokines and Cytokine Gene Polymorphisms in Chronic Lymphocytic Leukaemia, in Primary Sjogren's Syndrome and Healthy Subjects. – Tampere. – 2002. – 81 p.
8. Sugiura Y., Niimi T., et al. Transforming growth factor β 1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis // *Annals of the Rheumatic Diseases.* – 2002. – V. 61. – P. 826-828.
9. Quasney M., Bronstein D., et al. Increased Frequency of Alleles Associated with Elevated Tumor Necrosis Factor- α Levels in Children with Kawasaki Disease // *Pediatric Research.* – 2001. – V. 49. – P. 686-690.
10. Имангулова, М. М., Бикмаева А. Р., Хуснутдинова Э. К. Полиморфизм кластера гена интерлейкина 1 у больных туберкулезом легких // *Цитокины и воспаление.* – 2005. – Том 4, N 1. – С. 36-41.
11. Schlesselman J. Case – control studies. Design, conduct, analysis. – New York: Oxford University Press., 1982. – P. 58-96.
12. Futrakul N., Butthep P., Patumraj S. et al. Enhanced tumor necrosis factor in the serum and renal hyperperfusion in nephrosis associated with focal segmental glomerulosclerosis // *Ren. Fail.* – 2000. – Vol.22. – №22. – P.213-217.
13. Иванов В.П., Полоников А.В. Полиморфизм гена NAT 2 при инфекционно-аллергической бронхиальной астме и его связь с возрастом манифестации и степенью тяжести заболевания // *Мед. генетика.* – 2004. – Т.3, №4. – С. 480-483.
14. Фрейдлин И.С. Ключевая позиция макрофагов в цитокиновой регуляторной сети // *Иммунология.* – 1995. – №3. – С. 44-48
15. Насонов Е.Л. Современные направления иммунологических исследований при хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваниях человека // *Тер. архив.* – 2001. – №8. – С. 43-46.
16. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // *Цитокины и воспаление.* – 2002. – №1. – С. 2-5.
17. Паунова С.С. Ангиотензин II – современное представление о патогенезе нефросклероза // *Нефрология и диализ.* – 2003. – №4. – С. 353-356.



SOME RESULTS OF MOLECULAR-GENETIC AND IMMUNOLOGICAL STUDIES IN PATIENTS WITH RENAL PATHOLOGY

**I.A. YUSHINA¹,
E.V. KALMYKOVA¹,
E.V. NEKIPELOVA²,
M.I. CHURNOSOV¹**

¹Belgorod State University

e-mail: yushina@bsu.edu.ru

*²Regional clinical hospital St.
Iosaf, Belgorod*

Humoral immunity at patients chronic glomerulonephritis on the basis of the data on levels IgA, IgG, IgM was studied. Significant infringements humoral a link of immunity – high contents IgA and IgG at patients chronic glomerulonephritis which depend on clinical group CGN and a level proteinuria are revealed. Clinical variants CGN and gender features at patients CGN do not influence concentration of antibodies. Methods cluster and factorial analyses show significant differentiation of groups of patients CGN receiving replaceable therapy and with an allograft of a kidney, and also patients with high proteinuria from other groups of patients and control group. Studied of frequencies genotypes of tumor necrosis factor α gene, tumor necrosis factor receptor of 1 type gene, tumor necrosis factor β gene the transforming growth factor and interleukin 1B gene at patients with chronic glomerulonephritis.

Key words: chronic glomerulonephritis, chronic renal failure, antibodies, polymorphism of cytokines genes.