

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXIX
2009
SUPPLEMENT 7**



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Barbara Bullo

**POSZUKIWANIE DIAGNOSTYCZNO-PROGNOSTYCZNYCH
WSKAŹNIKÓW EFEKTYWNOŚCI LECZENIA
CYKLOFOSFAMIDEM CHORYCH
Z NEFROPATIĄ TOCZNIOWĄ**

***SEARCH FOR DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MARKERS
OF CYCLOPHOSPHAMIDE TREATMENT EFFICACY
IN LUPUS NEPHROPATHY PATIENTS***

**Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii
i Chorób Wewnętrznych
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Prof. dr hab. med. Bolesław Rutkowski**

GDAŃSK 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Zbigniew Machaliński,
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Zdzisław Bereznowski, prof. dr Andrzej Hellmann,
prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Podziękowania

***Wyrażam głęboką wdzięczność
Panu Profesorowi Bolesławowi Rutkowskiemu
za wszechstronną pomoc oraz motywację do pisania tej pracy***

***Panu Profesorowi Zbigniewowi Zdrojewskiemu
za wsparcie merytoryczne w prowadzeniu chorych z nefropatią
toczniową***

***Pani Magdalenie Hinz
za ogromną pracę włożoną w redagowanie tej pracy***

***Grzegorzowi Pionteckiemu
za wsparcie i cierpliwość***



SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	11
1.1. Nefropatia toczniowa: dane kliniczne, klasyfikacja, ocena zmian histopatologicznych	11
1.2. Wskaźniki kliniczne i laboratoryjne istotne w monitorowaniu przebiegu nefropatii toczniowej	15
1.3. Leczenie nefropatii toczniowej	17
1.3.1. Steroidy w leczeniu nefropatii toczniowej	17
1.3.2. Azatiopryna w leczeniu nefropatii w przebiegu tocznia rumieniowatego układuowego	18
1.3.3. Cyklofosfamid (CYC) w leczeniu nefropatii toczniowej	19
1.3.4. Cyklosporyna w leczeniu aktywnej nefropatii toczniowej	21
1.3.5. Mykofenolan mofetilu (MMF) w leczeniu nefropatii toczniowej	22
1.3.6. Terapia biologiczna w nefropatii toczniowej: nowe leki immunosupresyjne	23
1.4. Ogólne zalecenia w leczeniu nefropatii toczniowej	25
2. CEL	26
3. MATERIAŁ I METODY	27
3.1. Materiał kliniczny	27
3.1.1. Schemat leczenia dożylnymi pulsami cyklofosfamidu (CYC)	29
3.1.2. Leczenie dodatkowe	30
3.1.3. Monitorowanie leczenia pulsami cyklofosfamidu	30
3.1.4. Podział grupy badawczej ze względu na efekt leczenia cyklofosfamidem	31
3.1.5. Charakterystyka chorych reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem	31
3.2. Metody	33
3.2.1. Metody laboratoryjne	33
3.2.2. Ocena morfologiczna biopsji nerki	35
3.2.3. Metody analizy statystycznej	36
4. WYNIKI BADAŃ	37
4.1. Ocena stanu pacjentów przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem	37
4.1.1. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie pacjentów reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem (CYC)	38
4.1.2. Ocena stanu pacjentów z uwzględnieniem wielkości dobowego wydalania białka z moczem	41
4.1.3. Ocena wyników badań odróżniających pacjentów reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem	47

4.2. Ocena efektu leczenia cyklofosfamidem u pacjentów okresie pierwszych sześciu miesięcy terapii	52
4.2.1. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów w okresie sześciomiesięcznego leczenia cyklofosfamidem	52
4.2.2. Ocena zmian najważniejszych wskaźników choroby w trakcie sześciomiesięcznego leczenia cyklofosfamidem	57
4.3. Ocena efektu leczenia immunosupresyjnego pacjentów w okresie od sześciu do dwunastu miesięcy	61
4.3.1. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów w okresie od szóstego do dwunastego miesiąca leczenia immunosupresyjnego	61
4.3.2. Ocena zmian najważniejszych wskaźników przebiegu choroby między szóstym a dwunastym miesiącem leczenia immunosupresyjnego	65
4.4. Ocena funkcji nerek w okresie dwunastu miesięcy leczenia immunosupresyjnego	72
4.5. Ocena stanu gospodarki białkowej i lipidowej w czasie dwunastu miesięcy leczenia immunosupresyjnego	75
5. DYSKUSJA	77
6. WNIOSKI	95
7. PIŚMIENNICTWO	96
8. STRESZCZENIE	109
9. SUMMARY	114

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ACR** – Amerykańskie Kolegium Reumatologiczne, *American College of Rheumatology*
- ANA** – przeciwciała przeciwjądrowe, *antinuclear antibodies*
- AMP** – adenzynomonofosforan, *adenosine monophosphate*
- C3** – składowa dopełniacza C3
- C4** – składowa dopełniacza C4
- CsA** – cyklosporyna A, *cyclosporine A*
- CYC** – cyklofosfamid, *cyclophosphamide*
- DNA** – kwas dezoksyrybonukleinowy, *deoxyribonucleic acid*
- dsDNA** – natywny dwuniciowy DNA, *double-stranded DNA*
- nDNA** – natywny DNA, *native DNA*
- Ecyt** – wskaźnik erytrocyturii
- EM** – mikroskop elektronowy, *electron microscope*
- GFR** – wielkość filtracji kłębuszkowej, *glomerular filtration rate*
- eGFR** – wielkość filtracji kłębuszkowej, wyliczana ze skróconego wzoru MDRD, *estimated glomerular filtration rate*
- GMP** – guanozynomonofosforan, *guanosine monophosphate*
- IF** - mikroskop immunofluorescencyjny, *immunofluorescent microscope*
- IgA** – immunoglobulina klasy A
- IgG** – immunoglobulina klasy G
- IgM** – immunoglobulina klasy M
- IMP** – inozynomonofosforan, *inosine monophosphate*
- LM** – mikroskop świetlny, *light microscope*
- LN** – nefropatia toczniowa, *lupus nephritis, lupus nephropathy*
- KL_{KR}** – klirens kreatyniny endogennej
- KZN** – kłębuszkowe zapalenie nerek, *chronic glomerulonephritis*
- MMF** – mykofenolan mofetilu, *mycophenolate mofetil*
- MAP** – średnie ciśnienie tętnicze, *mean arterial pressure*
- NIH** – Narodowy Instytut Zdrowia, *National Institute of Health*
- NNP** – nienerczycowa proteinuria
- N-RE** – niereagujący, *non responders*
- r** – współczynnik korelacji
- RE** – reagujący, *responders*
- RNA** – kwas rybonukleinowy, *ribonucleic acid*
- RNP** – rybonukleoproteina, *ribonucleoprotein*
- SD** – odchylenie standardowe, *standard deviation*
- SE** – błąd standardowy średniej, *standard error*
- SLE** – toczeń rumieniowaty układowy, *systemie lupus erythematosus*
- SSA** – antygen SS-A (antygen Ro)
- SSB** – antygen SS-B (antygen La)

Sm – antygen Sm

UPR – wydalanie białka z moczem, *urine protein excretion*

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia, *World Health Organization*

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α , *Tumor Necrosis Factor- α*

wpw – w polu widzenia, *high power field, hpf*

ZN – zespół nerczycowy

1. WSTĘP

1.1. Nefropatia toczniowa: dane kliniczne, klasyfikacja, ocena zmian histopatologicznych

Nefropatia toczniowa (*lupus nephritis*, *lupus nephropathy*, LN) należy do częstych powikłań tocznia rumieniowatego układowego (*systemic lupus erythematosus*, SLE). Uważa się, że rozwija się ona u około 60-80% chorych z rozpoznaniem tego schorzenia [39, 40]. Obraz kliniczny nefropatii jest różnorodny, od postaci łagodnych z obserwowanymi niewielkimi zmianami w moczu do szybko postępującej niewydolności nerek [3, 8, 98, 101, 116, 138]. Najczęściej u pacjentów, głównie płci żeńskiej, będących pod ambulatoryjną opieką reumatologiczną obserwuje się pojawienie zmian w moczu pod postacią białkomoczu i krwinkomoczu. Pierwszym objawem nefropatii toczniowej może być duży białkomocz z klinicznym obrazem zespołu nerczycowego (ZN). Często zespół nerczycowy rozwija się nagle, jako jeden z objawów bardzo aktywnej choroby układowej nawet u chorych, u których wcześniej nefropatii nie rozpoznawano. W momencie postawienia rozpoznania choroby układowej już u około 50% chorych obserwuje się nefropatię, co przekłada się na zalecenia Amerykańskiego Kolegium Reumatologicznego (*American College of Rheumatology*, ACR), które mówią, że stanowi ona jedno z głównych kryteriów rozpoznania tocznia rumieniowatego układowego [8, 160].

Przebieg nefropatii toczniowej może prezentować różnorodny obraz kliniczny, zaczynając od niewielkich zmian w moczu (nieznaczny białkomocz z lub bez erytrocyturii), poprzez zespół nerczycowy z dobowym wydalaniem białka z moczem nawet do kilkunastu gramów czy w końcu z rozwojem postępującej niewydolności nerek. Rzadko obserwuje się przypadki gwałtownie postępującego kłębuszkowego zapalenia nerek, obciążone poważnym rokowaniem odnośnie powrotu funkcji nerek [8, 39, 169]. U chorych z nefropatią toczniową, u których pomimo leczenia utrzymuje się białkomocz powyżej 1,0 g na dobę obserwuje się powolny postęp przewlekłej choroby nerek, co w końcu doprowadza po wielu latach do konieczności leczenia nerkozastępczego [6, 66, 113, 120]. W tym przypadku do obrazu morfologicznego nefropatii toczniowej mogą dołączać się inne zmiany, a związane z wieloletnim nadciśnieniem tętniczym, przyjmowaniem leków nefrotoksycznych, cukrzycą czy też otyłością.

Różnorodny obraz kliniczny nefropatii toczniowej posiada swoje odzwierciedlenie w obrazie morfologicznym biopsji nerki. W celu usystematyzowania zmian biopsyjnych, co w konsekwencji ma znaczenie dla rodzaju zastosowanej terapii, wprowadzono Klasyfikację Nefropatii Toczniowej przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organization*, WHO) w 1974 roku. Na przestrzeni lat poddawano ją modyfikacjom w 1982 roku i 1995 roku [8, 40]. Obecnie obowiązującą klasyfikację WHO podano w tabeli 1.

Tabela 1. Klasyfikacja nefropatii toczniowej według Światowej Organizacji Zdrowia (po modyfikacji w 1995 roku)

Table 1. The World Health Organization classification of Lupus Nephritis (modified 1995)

<p>Klasa I: Prawidłowe kłębuszki a) obraz prawidłowy LM, IF, EM b) obraz prawidłowy LM, lecz depozyty w IF lub EM</p>
<p>Klasa II: Czyste zmiany mezangialne (mezangiopatia) a) przyrost macierzy i/lub niewielki rozplem k.m. (+) b) średni rozplem k.m. (++)</p>
<p>Klasa III: Ogniskowe segmentalne KZN z obecnością niewielkich lub średnich zmian w mezangium a) z „aktywnymi” zmianami martwiczymi b) z „aktywnymi” i stwardnieniowymi zmianami c) ze zmianami stwardnieniowymi</p>
<p>Klasa IV: Rozlane rozplemowe KZN (nasiloną proliferacją mezangialną, endokapilarną lub mezangiokapilarną z/lub masywnymi depozytami podśródbłonkowo) a) bez zmian segmentalnych b) z „aktywnymi” zmianami martwiczymi c) zmiany „aktywne” i stwardnienie kłębuszków d) ze stwardnieniem kłębuszków</p>
<p>Klasa V: Rozlane błoniaste KZN a) czyste błoniaste KZN b) obecne zmiany klasy II (a lub b) c) obecne zmiany klasy III (a-c) d) obecne zmiany klasy IV (a-d)</p>
<p>Klasa VI: Zaawansowane stwardnienie kłębuszków</p>

LM – mikroskop świetlny

IF – mikroskop immunofluorescencyjny

EM – mikroskop elektronowy

KZN – kłębuszkowe zapalenie nerek

k.m. – komórki mezangialne

W 2003 grupa nefrologów i nefropatologów zaproponowała nową rozszerzoną klasyfikację *lupus nephritis* [tabela 2], opublikowaną w *Kidney Int.* [167], która również jest modyfikacją klasyfikacji WHO. Jest ona zdecydowanie bardziej szczegółowa i dokładniejsza, tak że wiele ośrodków na świecie nadal posługuje się prostszą klasyfikacją WHO z 1995 roku.

Tabela 2. Klasyfikacja nefropatii toczniowej według *International Society of Nephrology/ Renal Pathology Society (ISN/RPS)* z 2003 roku

Table 2. *The International Society of Nephrology / Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003 Classification of Lupus Nephritis*

Klasa I:	Minimalne zmiany mezangialne Prawidłowe kłębuszki w LM Mezangialne depozyty immunoglobulin w IF
Klasa II:	Zmiany mezangialne proliferacyjne rozplem komórek mezangium różnego stopnia, przerost macierzy mezangium w LM, złogi immunoglobulin w mezangium podśródbłonkowe lub podnabłonkowe depozyty, obecne w IF lub EM, lecz bez w LM
Klasa III:	Zmiany ogniskowe aktywne (A) lub nieaktywne ogniskowe, segmentalne (S) lub globalne (G) wewnątrz- lub zewnątrzłośniczkowe KZN, zajmujące poniżej 50% kłębuszków typowe złogi podśródbłonkowe ogniskowo, z/bez zmianami w mezangium III (A): Zmiany aktywne: ogniskowe proliferacyjne III (A/C): Zmiany aktywne i przewlekłe (C): ogniskowe proliferacyjne i stwardnieniowe
Klasa IV:	zmiany aktywne lub nieaktywne rozlane segmentalne, globalne wewnątrz- lub zewnątrzłośniczkowe KZN zajęte >50% kłębuszków rozlane podśródbłonkowe złogi immunoglobulin obecne lub nie zmiany w mezangium segmentalne lub globalne (IV-S lub IV-G) IV-S (A): zmiany aktywne (rozlane segmentalne proliferacyjne LN) IV-G (A): zmiany aktywne (rozlane globalne proliferacyjne LN) IV-S (A/C): zmiany aktywne i przewlekłe (rozlane segmentalne proliferacyjne i stwardniające LN) IV-G (A/C): zmiany aktywne i przewlekłe (rozlane globalne proliferacyjne i stwardniające LN) IV-S (C): przewlekłe nieaktywne zmiany (rozlane segmentalne stwardniające LN) IV-G (C): przewlekłe zmiany nieaktywne (rozlane globalne stwardniające LN)
Klasa V:	Błoniaste KZN globalne lub segmentalne podnabłonkowe złogi immunoglobulin lub podobnej morfologii zmiany w LM i IF, EM z/bez zmianami w mezangium Klasa V może występować w kombinacjach z III i IV Klasa V mogą występować zmiany zaawansowane jak stwardnienie kłębuszków

Klasa VI:
Zaawansowane zmiany stwardnieniowe w kłębuszkach
> 90% kłębuszków globalnie stwardniałych,
bez cech aktywności

LM – mikroskop świetlny; *light microscope*

IF – mikroskop immunofluorescencyjny; *immunofluorescent microscope*

EM – mikroskop elektronowy; *electron microscope*

KZN – kłębuszkowe zapalenie nerek; *chronic glomerulonephritis*

LN – nefropatia toczniowa; *lupus nephritis*

Przebieg kliniczny nefropatii toczniowej jest w dużym stopniu powiązany z morfologicznym obrazem zmian w biopsji nerki oraz klinicznymi przejawami nefropatii, jakimi jest obecność białka i krwinek czerwonych w moczu [9, 101, 142]. Ten ostatni jest głównym wskaźnikiem aktywności procesu zapalnego w kłębuszku. Erytrocyturia wynika z przerwania ciągłości ściany naczyniowej i wytworzenia w niej, tzw. dziur [22, 100]. Prawdopodobnie dziury powstają w wyniku reakcji enzymów proteolitycznych, uwalnianych przez komórki zapalne. Natomiast odkładanie się dużej ilości złogów kompleksów immunologicznych wzdłuż błony podstawnej kłębuszka, a w konsekwencji jej uszkodzenie, jest jedną z przyczyn wystąpienia białkomoczu [85, 100]. Inną przyczyną białkomoczu jest uszkodzenie podocyta, kolejnego składnika bariery filtracyjnej. Pierwszym członem w rozwoju procesu zapalnego w mezangium jest odkładanie się w tym miejscu złogów kompleksów immunologicznych, co powoduje migrację komórek zapalnych, które rozpoczynają produkując różnych cytokin. W konsekwencji prowadzi to do nasilonej proliferacji komórek mezangialnych oraz produkcji macierzy mezangialnej [22, 150, 151]. Współistnienie wymienionych zmian morfologicznych w kłębuszku nerkowym, jak też duże ich nasilenie, może spowodować tak znaczące upośledzenie filtracji kłębuszkowej, które klinicznie przekłada się na rozwój niewydolności nerek. Przy tym obrazie morfologicznym, postępującej niewydolności nerek bardzo często towarzyszy ciężki zespół nerczycowy. Jak na razie nie wydaje się, byśmy potrafili postaciom morfologicznym przypisać konkretny obraz kliniczny nefropatii. Dla przykładu, zespół nerczycowy występuje najczęściej w IV klasie WHO, ale w może pojawić się w III klasie WHO, V klasie WHO, a nawet VI klasie WHO. Chociaż występowanie zespołu nerczycowego w przypadku rozpoznania klasy VI WHO nie jest jednoznaczne, jako że stan ten oznacza nieodwracalne przewlekłe zmiany w nerkach i w tym przypadku nie powinien występować duży białkomocz. W przypadku posługiwania się klasyfikacją ISN/RPS takie zmiany opisano jako IV klasa, z obecnością zmiany typu globalne (*global*) i przewlekłe (*chronic*) (G/C). Wydaje się zatem, że w pojedynczych przypadkach zmiany typu IV G/C oraz VI mogą być nie do rozróżnienia. Nienerczycowa proteinuria występuje u chorych z rozpoznaniem częściowej klasy III WHO, ale może być obecna

w IV, V i VI klasie WHO. Przy obecności zmian morfologicznych w nerce opisywanych jako klasa I i II WHO (ISN/RPS) mogą nie być obserwowane żadne zmiany w moczu, jedynie w klasie II może wystąpić niewielki białkomocz, zwykle poniżej 1,0 g na dobę i/lub może być obecna niewielka erytrocyturia, ale nie większa niż od 5 do 10 erytrocytów w polu widzenia. Wątpliwości te wskazują na celowość i konieczność wykonywania biopsji nerki u chorych z nefropatią toczniową [25, 32, 57, 78, 119, 128, 131, 133, 134, 139]. Zgodnie z obowiązującymi zaleceniami biopsję nerki wykonuje się u chorych z podejrzeniem nefropatii toczniowej i białkomoczem powyżej 1,0 g na dobę z/bez erytrocyturią [76, 102, 114]. Otrzymany wynik powinien pozwolić na wprowadzenie odpowiedniego leczenia immunosupresyjnego [14, 24, 63, 74, 99]. W leczeniu nefropatii toczniowej stosowanych jest kilka leków immunosupresyjnych i, jak na razie nie posiadamy jednolitego schematu leczenia. Nadal otwartym problemem pozostaje czas trwania terapii immunosupresyjnej oraz dawkowanie tych leków. Większość badań nad leczeniem nefropatii toczniowej są doświadczeniami pojedynczych ośrodków oraz opublikowano kilka badań wieloośrodkowych [7, 30, 45, 46, 73, 77, 90, 91, 125, 172]. Postuluje się zatem, by po roku terapii immunosupresyjnej wykonywać kontrolną biopsję nerki, która zadecyduje o dalszym leczeniu, co w praktyce klinicznej nie zawsze jest możliwe do przeprowadzenia. Po pierwsze: a) narażamy chorego po raz kolejny na badanie inwazyjne, nie biorąc pod uwagę, że chorzy z *lupus nephritis* często w ciągu swojego życia mają wykonywanych kilka biopsji nerki z powodu nawrotów nefropatii; po drugie: b) nie zawsze jest możliwe wykonanie biopsji nerki, np. z powodu odmowy chorego, współistnienia zaburzeń krzepnięcia (małopłytkowość), otyłości czy braku zgody na przetaczanie krwi i preparatów krwiopochodnych z przyczyn religijnych. Z wymienionymi powyżej sytuacjami mieliśmy wielokrotnie do czynienia w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Niezależnie zatem od wykonywania kolejnych biopsji nerki poszukuje się innych prostszych wskaźników monitorowania leczenia immunosupresyjnego *lupus nephritis*.

1.2. Wskaźniki kliniczne i laboratoryjne istotne w monitorowaniu przebiegu nefropatii toczniowej

Ocena leczenia nefropatii toczniowej polega na ocenie aktywności choroby nerek, co oznacza monitorowanie wydalania białka i krwinek czerwonych z moczem oraz monitorowanie parametrów funkcji nerek, czyli: stężenia kreatyniny i wielkości eGFR, liczonego według wzoru MDRD albo oznaczanego jako wielkość klirensu kreatyniny endogennej [9, 15, 28, 53, 76, 87, 106]. Wydalanie białka z moczem można oceniać z dobowej zbiórki moczu albo z porcji rannej i wówczas ilość białka wydalonego z moczem przelicza się na gram kreatyniny w moczu. Obie metody pomiaru są równoważne, a rodzaj metody zależy od własnych

doświadczeń ośrodka klinicznego. Dodatkowo monitoruje się zaburzenia gospodarki białkowej i lipidowej, które głównie są wynikiem tracenia białek z moczem. Zaburzenia gospodarki białkowej monitoruje się z zależności od wielkości białkomoczu oraz stanu klinicznego pacjenta. Przekłada to się między innymi na obecność obrzęków czy na ilość wydalonego moczu.

W ocenie leczenia nefropatii toczniowej bierze się pod uwagę także ocenę aktywności choroby autoimmunologicznej, jakim jest toczень rumieniowaty układowy. Monitorowanie to polega na ocenie klinicznej. Przykładowo stosuje się tutaj różne skale, jak: *Safety of Exogenous Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment / Systemie Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SELENA-SLEDAI* czy *British Isles Lupus Assessment Group Scale - BILAG* [33]. Skale te opierają się głównie na ocenie objawów reumatologicznych i dermatologicznych choroby. Mniej miejsca poświęcone jest występowaniu innych objawów choroby, w tym: nerkowych lub hematologicznych.

W diagnostyce SLE ważne miejsce zajmują badania immunologiczne [39, 155, 168, 171, 173]. Obecność przeciwciał skierowanych przeciw antygenom jądrowym (ANA) czy przeciwciał przeciwjądrowych anty-Sm stanowią kryteria rozpoznania SLE zgodnie z zaleceniami ACR. Obecnie istnieją możliwości oznaczania bardzo różnych rodzajów przeciwciał [164, 171]. O ile rola tych badań w diagnostyce choroby jest jednoznaczna, o tyle w monitorowaniu leczenia istnieją pewne kontrowersje. Na pierwszy plan wysuwają się przeciwciała skierowane przeciwko składnikom jądra komórkowego – przeciwciała przeciwjądrowe, *antinuclear antibodies* – ANA. Występują one w większości przypadków choroby. W grupie przeciwciał ANA wyróżnia się inne rodzaje, występujące zdecydowanie rzadziej, a należą do nich: przeciwciała skierowane przeciw antygenowi Sm, skierowane przeciw rybonukleoproteinie (RNP), przeciw antygenowi SSA (Ro) i SSB (La), przeciw nukleosomowe, przeciw składowej dopełniacza C1q [97]. Wymienione przeciwciała posiadają ograniczone znaczenie kliniczne, dlatego że występują tylko w pewnym procencie chorych z SLE [45, 49, 108]. Żadne z wymienionych przeciwciał nie posiada swoistości dla występowania tylko u pacjentów z rozpoznaniem nefropatii toczniowej.

Przeciwciała skierowane przeciwko DNA należą do grupy kolejnych przeciwciał, które mają znaczenie w diagnostyce choroby układowej. Wykonuje się oznaczenia przeciwciał przeciw natywnemu DNA (nDNA) lub przeciw natywnemu dwuniciowemu DNA (dsDNA). Uważa się, że te przeciwciała są bardziej charakterystyczne dla pacjentów z powikłaniami nerkowymi SLE [29, 108, 110, 130, 164]. Niestety u około 30% chorych z aktywną nefropatią toczniową nie stwierdza się obecności tych przeciwciał.

W ocenie aktywności immunologicznej choroby pomocne jest oznaczanie stężenia składowych dopełniacza C3 i C4 oraz stężenia immunoglobulin klasy A, G, M. U zdecydowanej większości chorych z aktywną chorobą układową występuje obniżenie stężenia składowej C3, rzadziej C4 dopełniacza (hipokomplementemia)

[106, 115, 134, 143, 155]. Dodatkowo może pojawić się hipergammaglobulinemia, czyli podwyższone stężenie immunoglobulin klasy G, zwłaszcza u chorych wcześniej nieleczonych immunosupresyjnie. U pacjentów z zespołem nerczykowym, pomimo stwierdzonej wysokiej aktywności klinicznej i immunologicznej choroby poziom IgG może być prawidłowy lub obniżony z powodu utraty ich z moczem [8, 10].

Monitorowanie leczenia nefropatii toczniowej polega na wykonywaniu dużej ilości badań, w tym kosztownych badań immunologicznych. Częstość wykonywania ich zależy od schematu, jaki obowiązuje w danym ośrodku klinicznym.

1.3. Leczenie nefropatii toczniowej

W leczeniu nefropatii toczniowej stosuje się co najmniej kilka leków immunosupresyjnych. Podstawowa terapia opiera się na leczeniu steroidami, wzbogaconą o takie leki, jak: cyklofosfamid, azatiopryna, cyklosporyna czy mykofenolan mofetilu. Ten klasyczny zestaw leków może być w najbliższych latach zastąpiony lekami zaliczanymi do tzw. terapii biologicznej takich, jak: abatacept, rituksymab, epratuzumab czy ocrelizumab [84,104,132,145,149,165].

1.3.1. Steroidy w leczeniu nefropatii toczniowej

Steroidy, a dokładniej hormony kory nadnerczy – glikokortykosteroidy są lekami immunosupresyjnymi o działaniu wielokierunkowym: działają supresyjnie na makrofagi, zmniejszają wytwarzanie cytokin zapalnych (m.in. interleukiny 1, interleukiny 3, interleukiny 4, interleukiny 6, czynnika martwicy nowotworów α – TNF- α , liganda DC40 i innych) oraz czynników adhezyjnych, indukują apoptozę limfocytów, hamują migrację leukocytów przez ścianę naczyń krwionośnych. W dużych dawkach nasilają katabolizm immunoglobulin i poprzez wpływ na limfocyty B zmniejszają ich produkcję. Obowiązującym schematem leczenia jest podawanie pulsów dożylnych metylprednizolonu, zwykle w dawce łącznej 3,0 g, a następnie postaci doustnej: prednizonu, prednizolonu czy metylprednizolonu [1, 16, 39]. W aktywnej nefropatii toczniowej, kiedy w biopsji nerki stwierdza się zmiany III, IV, Vb klasę WHO należy do steroidów dołączyć inny lek immunosupresyjny [39, 76, 102]. U chorych z rozpoznaniem toczenia rumieniowatego układowego, otrzymujących przewlekłe steroidy i w przypadku pojawienia się nieznacznego białkomoczu, zwiększa się dawkę leków doustnych lub podaje się steroidy w postaci pulsów dożylnych. Ten schemat leczenia funkcjonuje w wielu ośrodkach. Obecność zmian morfologicznych w biopsji nerki - I lub II klasa WHO nie wskazują na konieczność modyfikacji leczenia i zastosowania cytostatyków. Steroidy mają pozytywne działanie na zmiany morfologiczne w kłębuszku nerkowym poprzez zmniejszenie

prolifracji mezangialnej, odkładania się złogów kompleksów immunologicznych. Nie mają wpływu na procesy przewlekłe, toczące się na terenie kłębuszka nerkowego, wręcz uważa się, że mogą nasilać procesy włóknienia śródmiąższu. Efektywność leczenia steroidami nefropatii toczniowej jest wynikiem wpływu leku na ogólną aktywność choroby układowej, tworzenie się kompleksów immunologicznych i ich odkładanie się w wielu narządach, hamowanie produkcji przeciwciał zdecydowanie bardziej, niż na procesy toczące się w kłębuszku nerkowym. Główny problem leczenia steroidami nie wynika z ich bezpośredniego, być może nefrotoksycznego wpływu na nerki. Przede wszystkim faktem pozostaje, że wieloletnie leczenie steroidami obciążone jest powikłaniami ze strony innych narządów. Otyłość, cukrzyca posteroidea, osteoporoza, nadciśnienie tętnicze, choroba wrzodowa, zaćma czy jaskra wymuszają konieczność poszukiwania stale nowych leków, które mogłyby zastąpić steroidy w leczeniu SLE i innych chorób autoimmunologicznych. Obecnie przeważają poglądy o stosowaniu przewlekłe mniejszych dawek steroidów oraz podejmuje się próby odstawiania tego leczenia u chorych z łagodniejszą postacią SLE. Oczywiście dotyczy to chorych, którzy to leczenie przyjmują krótko, maksymalnie kilka lat [1, 80]. Należy podkreślić, że ze względu na przewlekłe powikłania steroidoterapii unika się obecnie podawania doustnie dużych dawek leku przez długi okres czasu oraz stale poszukuje się nowych leków, które zastąpiłyby steroidy w terapii nie tylko SLE, ale i innych chorób autoimmunologicznych.

1.3.2. Azatiopryna w leczeniu nefropatii w przebiegu toczenia rumieniowatego układowego

Azatiopryna należy do cytostatyków z grupy antymetabolitów. Jest ona imidazolowym analogiem puryn, hamującym syntezę kwasów nukleinowych. Należy do grupy leków „starych” i w chwili obecnej znacznie rzadziej znajduje zastosowanie w terapii nefropatii toczniowej. Mechanizm immunosupresyjnego działania azatiopryny związany jest z powstawaniem tionukleotydów, które kompetywnie hamują syntezę fosforybozylpirofosforanową, hamując wytwarzanie adenzynomonofosforanu (AMP), w mniejszym stopniu guanozynomonofosforanu (GMP). Ze względu na słaby efekt immunosupresyjny azatiopryny jest ona obecnie rzadko stosowana w leczeniu aktywnej nefropatii, ale nadal podaje się lek jako rodzaj leczenia podtrzymującego po leczeniu cyklofosfamidem lub mykofenolanem mofetilu [79, 81, 125, 147]. Azatiopryna jest lekiem, który wśród działań niepożądanych ma działanie hepatotoksyczne i mielotoksyczne. Niedokrwistość, leukopenia, trombocytopenia są przeciwwskazaniem do jej zastosowania. W bardzo aktywnej postaci SLE, w przebiegu której wymienione objawy kliniczne występują powszechnie, jest ona przeciwwskazana. Wzrost poziomów enzymów wątrobowych podczas leczenia azatiopryną występuje najczęściej u chorych z uszkodzeniem wątroby, co związane jest ze zmniejszeniem metabolizmu leku

i akumulacją aktywnych metabolitów. Nie może być ona podawana u chorych z przewlekłym uszkodzeniem wątroby, np. w przebiegu zapalenia wątroby typu B lub C. Lek nadal stosowany jest w leczeniu postaci skórnej SLE, rzadziej natomiast zalecany jest przez reumatologów. Azatioprynę stosuje się w dawce 1-2 mg/kg masy ciała/dobę. Wzrost transaminaz jako efekt hepatotoksycznego działania leku, leukopenia, objawy ze strony przewodu pokarmowego są wskazaniami do pilnego jego odstawienia. Opisywano pojedyncze przypadki aplazji szpiku po leczeniu azatiopryną oraz przypadki ostrego zapalenia trzustki, kończące się zgonem. Około 1/3 chorych z toczniem rumieniowatym układowym nie toleruje leczenia azatiopryną nawet w małych dawkach.

1.3.3. Cyklofosfamid (CYC) w leczeniu nefropatii toczniowej

Cyklofosfamid, cytostatyk z grupy leków alkilujących, należy do pochodnych iperytu azotowego. Głównym mechanizmem działania cytotoksycznego związków alkilujących jest uszkodzenie biologicznej aktywności DNA poprzez jego alkilację. Alkilowanie zasad purynowych powoduje rozluźnienie wiązania ich z resztą cukrową, czego wynikiem jest depurynacja cząsteczki DNA i rozpad łańcucha głównego. Związki alkilujące działają na wszystkie fazy cyklu komórkowego. Najsilniejsze działanie leku występuje w okresie, kiedy komórka syntetyzuje nadmierną ilość DNA, białek i RNA, wkraczając w fazę S. Dodatkowo lek fosforyluje białka cytoplazmatyczne, czego efektem jest przerwanie reakcji wewnątrzkomórkowych i, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki w mechanizmie apoptozy [135]. Podawanie cyklofosfamidu powoduje uszkodzenie wszystkich szybko dzielących się komórek, do których należą: komórki układu krwiotwórczego, nabłonka przewodu pokarmowego, komórki rozrodcze. Lek od wielu lat jest z powodzeniem stosowany w leczeniu aktywnej nefropatii toczniowej [5, 12, 17, 30, 41, 59, 62, 67, 77, 86, 103, 153, 157]. Po wielu latach podawania cyklofosfamidu zaczynamy zauważać pewne problemy związane z przewlekłym jego stosowaniem. Po przekroczeniu dawki kumulacyjnej leku, która w przypadku podawania leku parenteralnie wynosi 0,3 g/kg masy ciała, praktycznie dalsze leczenie z użyciem cyklofosfamidu jest przeciwwskazane. Nefropatia toczniowa ma tendencję do nawrotów, co związane jest z koniecznością powtarzania leczenia cyklofosfamidem. Cyklofosfamid miał zastosowanie w terapii także innych powikłań SLE, nie tylko w nefropatii. Takim wskazaniem była np.: ciężka niedokrwistość i leukopenia – niereagujące na steroidy, SLE z objawami uogólnionego zapalenia naczyń czy ciężka postać kliniczna z obecnością zapalenia opłucnej i osierdzia. Obserwowano przypadki kliniczne, kiedy u chorego nie można było zastosować cyklofosfamidu w leczeniu nefropatii toczniowej, gdyż w przeszłości dawkę kumulacyjną leku już chory otrzymał. Cyklofosfamid jako lek z grupy cytostatyków ma negatywny wpływ na płodność [23, 26, 31, 140]. Toczy

rumieniowaty układowy dotyczy przede wszystkim młodych kobiet w wieku rozrodczym. Zdarzały się przypadki braku zgody na leczenie tym lekiem z tego właśnie powodu. Chociaż podkreślano w badaniach klinicznych, że w grupie młodych kobiet, które otrzymały dawkę kumulacyjną leku parenteralnie poniżej 7,0 g, nie obserwuje się występowania niepłodności. Wymienione powyżej czynniki spowodowały, że podważono zasadność leczenia CYC i poszukiwano nowych leków immunosupresyjnych, które mogłyby go zastąpić. Z drugiej strony podjęto próbę podawania u chorych mniejszych dawek kumulacyjnych leku. Obecnie nie posiadamy jednolitego schematu leczenia nefropatii toczniowej z użyciem cyklofosfamidu. Większość danych opiera się na doświadczeniu pojedynczych ośrodków klinicznych. Przeprowadzono kilka badań klinicznych, które potwierdziły jego efektywność [7, 12, 30, 90, 91]. Problemem otwartym pozostaje droga podawania leku. Niektóre ośrodki kliniczne na świecie preferują leczenie doustne, które obarczone jest wieloma działaniami niepożądanymi i powikłaniami [39, 117]. W krótkim okresie leczenia możemy przekroczyć dawkę kumulacyjną leku, zwłaszcza że w aktywnej nefropatii podaje się cyklofosfamid w dawce 2-3 mg/kg masy ciała/dobę. U pacjentów z obniżonym GFR, preferuje się mniejsze dawki, ale mimo to może dochodzić do rozwoju powikłań takich, jak np.: ciężka leukopenia i niedokrwistość. Ponadto nie mamy pewności czy chory otrzymuje pożądaną dawkę leku. Pacjenci leczeni obawiają się przyjmowania toksycznych leków doustnie. Nierzadko sami zmniejszają ich dawkę lub odstawiają. Nierzadko też przyjmują lek nieregularnie. W Klinice Nefrologii Transplantologii i Chorób Wewnętrznych preferowane jest podawanie CYC w trybie pulsów dożylnych raz w miesiącu. W ośrodkach reumatologicznych, ale też nefrologicznych podaje się pulsy CYC co 2 tygodnie, by uniknąć toksycznych objawów, związanych z bezpośrednim podawaniem leku dożylnie [70, 88, 89, 121]. Ze względu na znaczny procent chorych leczonych w tutejszej Klinice, którzy byli czynni zawodowo lub w trakcie pobierania nauki preferowane było podawanie pulsów parenteralnie jeden raz w miesiącu. Konsensus, dotyczący rozpoznania i leczenia nefropatii toczniowej opracowany przez europejską grupę badaczy [76] zaleca CYC głównie w leczeniu indukcyjnym nefropatii. Generalnie wybór leku jest uzależniony od ciężkości przebiegu choroby układowej oraz wcześniejszego leczenia immunosupresyjnego i odpowiedzi na to leczenie. Leczenie indukcyjne powinno być prowadzone około trzech miesięcy i nie zaleca się jego przedłużania powyżej sześciu miesięcy. W leczeniu podtrzymującym preferuje się inne leki: azatioprynę, mykofenolan mofetilu czy sterydy.

Cyklofosfamid pozostaje nadal lekiem numer jeden w leczeniu aktywnej nefropatii toczniowej [137]. U chorych z dużą aktywnością kliniczną i immunologiczną choroby jest lekiem najbardziej efektywnym. Można go podawać u chorych z prawidłową funkcją nerek, jak i z obniżoną. Podkreśla się wysoką efektywność leku w terapii ciężkich postaci nefropatii, w tym z ciężkim zespołem nerczycowym i postępującą niewydolnością nerek.

1.3.4. Cyklosporyna w leczeniu aktywnej nefropatii toczniowej

Cyklosporyna jest lekiem bardzo dobrze poznanym, a wprowadzona była do leczenia już w latach 80 jako podstawowa terapia immunosupresyjna u chorych po transplantacji narządów unaczynionych. Pomimo dużego postępu i wprowadzeniu nowych leków immunosupresyjnych nadal z powodzeniem stosowana jest w transplantologii. Cyklosporyna należy do grupy leków – inhibitorów kalcyneuryny. W wyniku jej działania dochodzi do zahamowania kalcyneuryny, a konsekwencji zmniejszenia wytwarzania interleukiny 2, głównej cytokiny biorącej udział w aktywacji limfocytów. Cyklosporyna wywiera wpływ także na inne komórki immunokompetentne, jak: makrofagi, monocyty, komórki prezentujące antygen oraz oddziałuje bezpośrednio na limfocyty B (zmniejsza ekspresję liganda CD40). W okresie terapii cyklosporyną ważne jest skuteczne zahamowanie kalcyneuryny, które uzyskuje się poprzez stosowanie odpowiednich dawek i utrzymanie odpowiednich stężeń leku w surowicy. Cyklosporyna znajduje swoje miejsce także w leczeniu glomerulopatii, zwłaszcza przebiegających z zespołem nercycowym. W tym przypadku wykorzystuje się efekt immunosupresyjny leku oraz inny aspekt jego działania, jakim jest skurcz tętniczki doprowadzającej kłębuszka nerkowego i w konsekwencji zmniejszenie hiperfiltracji, a w efekcie spadek białkomoczu. Cyklosporyna jest stosowana również w leczeniu nefropatii w przebiegu tocznia rumieniowatego układuowego lub układowych zapaleń naczyń [83, 126, 162]. W przeciwieństwie do cyklofosfamidu można podawać lek latami bez ryzyka kumulacji dawki. Nie powoduje leukopenii czy limfopenii. Zatem znajduje zastosowanie u chorych z SLE i zaburzeniami hematologicznymi, kiedy inne leki są przeciwwskazane. Cyklosporyna posiada jednak pewne ograniczenia. Jest lekiem nefrotoksycznym. Nie może być podawana u chorych, kiedy w biopsji nerki stwierdza się obecność zmian przewlekłych, a przebieg kliniczny nefropatii wskazuje na duże ryzyko ich rozwoju [68]. Dotyczy to chorych z obniżonym GFR, u których stężenie kreatyniny może być jeszcze w zakresie wartości prawidłowych. U chorych podwyższonego ryzyka rozwoju zmian przewlekłych dosyć charakterystyczne jest pojawienie się nadciśnienia tętniczego, którego wcześniej nie obserwowano i, które od początku wymaga terapii co najmniej 2 lub 3 lekami hipotensyjnymi. Rozwój nadciśnienia tętniczego wymaga odstawienia cyklosporyny. Leczenie to jest wręcz przeciwwskazane u chorych z nefropatią toczniową i obecnym od początku nadciśnieniem tętniczym, wymagającym terapii kilkoma lekami hipotensyjnymi. Przedstawione aspekty leczenia cyklosporyną nefropatii w przebiegu SLE oznaczają, że nie pozostaje ona lekiem zasadniczym w terapii LN, ale może być stosowana w pewnej określonej grupie chorych. Leczenie to powinno być dokładnie monitorowane poprzez oznaczanie poziomów leku w surowicy, monitorowanie funkcji nerek oraz dokładną kontrolę ciśnienia tętniczego.

1.3.5. Mykofenolan mofetilu (MMF) w leczeniu nefropatii toczniowej

Nowym lekiem immunosupresyjnym, który z powodzeniem jest podawany w nefropatii toczniowej to mykofenolan mofetilu, od około dwudziestu lat znany i stosowany w leczeniu immunosupresyjnym chorych po transplantacji narządów [71]. Lek należy do grupy leków antyproliferacyjnych, jest inhibitorem dehydrogenazy inozynomonofosforanu (IMP), kluczowego enzymu syntezy puryn „de novo”. W efekcie działania leku zahamowaniu ulega synteza kwasów nukleinowych, a zatem proliferacja komórek, głównie limfocytów. To działanie leku wykorzystano w transplantologii [2, 21]. Mykofenolan mofetilu wywiera szereg korzystnych działań również na inne komórki organizmu, nie tylko limfocyty. W badaniach doświadczalnych obserwowano pozytywny efekt leku na procesy patologiczne, toczące się na terenie kłębuszka nerkowego. MMF powodował ograniczenie proliferacji komórek mezangialnych i ich różnicowanie w kierunku miofibroblastów oraz produkcję macierzy mezangialnej. Stwierdzono zmniejszone odkładanie się w kłębuszku złogów kompleksów immunologicznych i kompleksu oraz wyraźne zmniejszenie nacieków komórkowych w śródmiaższu i ograniczenie włóknienia, towarzyszące przewlekłym glomerulopatiom. Ostatecznie stwierdzono, że mykofenolan mofetilu korzystnie wpływał na aktywne procesy, toczące się w kłębuszku nerkowym, jak proliferacja mezangialna. Na szczególną uwagę zasługuje wpływ leku na procesy przewlekłe (m.in. sklerotyzacja kłębuszka w wyniku nadmiernej produkcji macierzy mezangialnej), których efektem końcowym jest rozwój i postęp niewydolności nerek [13, 34, 35, 51, 156]. Korzystne działanie leku, wynikające z wpływu na procesy przewlekłe wykorzystano w leczeniu immunosupresyjnym u chorych po transplantacji narządów unaczynionych oraz także zastosowano MMF w terapii przewlekłych glomerulopatii [34, 37, 38, 48, 152], której szczególnym przykładem jest nefropatia toczniowa, a właściwie glomerulopatia toczniowa. Steroidy i cyklofosfamid, w odróżnieniu od MMF, wpływają korzystnie głównie na procesy aktywne, toczące się na terenie kłębuszka nerkowego i uważa się, że są bez wpływu na zmiany przewlekłe. Nawet steroidy mogą nasilać procesy włóknienia śródmiaższu. W 1999 roku w Klinice Nefrologii Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku po raz pierwszy zastosowano mykofenolan mofetilu w leczeniu nefropatii u pięciu pacjentek z rozpoznaniem toczniem rumieniowatym układowym [36]. Ze względu na ograniczoną dostępność leku podawano go przy zaistnieniu szczególnych wskazań takich, jak: aktywna nefropatia z zespołem nerczycowym, niereagująca na leczenie pulsami CYC czy też nawrót nefropatii po leczeniu cyklofosfamidem. MMF okazał się lekiem skutecznym w terapii *lupus nephritis*. Pierwsze doświadczenia związane z leczeniem nefropatii toczniowej pochodzą z końca lat 90. Początkowo były to małe grupy chorych, a do chwili obecnej przeprowadzono kilka badań wieloośrodkowych, które z jednej strony miały na celu ocenę leczenia MMF w LN, a z drugiej strony porównywano jego

efektywność z cyklofosfamidem [4, 7, 73, 90, 91, 172]. Badania te sugerowały, że MMF jest lekiem, który w najbliższej przyszłości ma szansę zastąpić cyklofosfamid w leczeniu LN [43, 45, 50, 55, 72, 73, 75, 111, 154, 166]. Niektóre z badań dotyczą jak na razie niezbyt licznych grup chorych, a jedynie badania *Chan i wsp.* [45, 46] oraz niedawno opublikowane badanie *Appel i wsp.* [7], dotyczą dużych populacji. Nieprawdopodobnie dobre wyniki leczenia *Chan i wsp.* [45, 46] mogą wynikać z doboru do badania chorych z łagodniejszą nefropatią. Tak wysoką efektywność MMF nie potwierdzono w innych badaniach [7, 149, 160]. Tym niemniej wysoka efektywność leku spowodowała, że w niektórych krajach MMF został zarejestrowany jako leczenie standardowe nefropatii toczniowej.

Obecna wiedza, dotycząca leczenia MMF, jest dosyć szeroka, ale do chwili obecnej nie wypracowano szczegółowych schematów leczenia, które wzięłyby pod uwagę: wskazania do rozpoczęcia terapii, czas trwania terapii, dawkowanie, MMF w indukcji czy w leczeniu podtrzymującym. Mykofenolan mofetilu może być podawany przewlekłe, nie istnieje bowiem ryzyko kumulacji dawki. Podawanie leku przez rok wydaje się być leczeniem za krótkim. Bardzo szybko obserwuje się nawroty nefropatii. W przypadku wieloletniego podawania leczenie takie jest bardzo kosztowne. W terapii nefropatii toczniowej, podobnie jak inne leki, omówione w tym wstępie, mykofenolan mofetilu również posiada swoje ograniczenia. Przeciwwskazaniem do jego zastosowania jest ciężka leukopenia, wówczas istnieje duże ryzyko powikłań infekcyjnych, zwłaszcza: zakażenia wirusami typu Herpes, Epstein-Barr'a czy cytomegalii. Chorzy po wielu latach immunosupresji mogą w ogóle nie tolerować leku lub jedynie małe dawki, które nie mają odpowiedniego efektu immunosupresyjnego. Wysokie ryzyko powikłań leczenia MMF wynikać może z indywidualnego dla chorego metabolizmu leku. Chorzy z zespołem nerczycowym, z niskimi stężeniami białek w surowicy mogą mieć wysokie poziomy kwasu mykofenolowego – czynnego metabolitu MMF, co szczególnie zwiększa ryzyko powikłań w tej grupie. Biorąc pod uwagę wszystkie pozytywne, jak i negatywne aspekty leczenia z użyciem MMF, pozostaje on efektywnym lekiem w terapii *lupus nephritis*, ale w ściśle określonej grupie pacjentów.

1.3.6. Terapia biologiczna w nefropatii toczniowej: nowe leki immunosupresyjne

Prawdopodobnie terapia biologiczna stanowi przyszłość leczenia immunosupresyjnego nefropatii toczniowej [161]. Wiadomo, że leki antycytokinowe: etanercept, infliksymab są powszechnie stosowane. W większości krajów, w tym w Polsce są zarejestrowane w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Crohn'a. Niewiele obecnie można powiedzieć na temat skuteczności takiego leczenia w innych chorobach

autoimmunologicznych, w tym w toczeniu rumieniowatym układowym. W trakcie badań klinicznych jest obecnie kilka leków i w najbliższej przyszłości okaże się czy leczenie to zostanie na stałe wprowadzone do terapii SLE [20, 60, 65, 82, 92, 141].

Abatacept jest pierwszym lekiem z nowej grupy – selektywnych modulatorów kostymulacji. Poprzez połączenie z molekułami B7-1 i B7-2, hamuje CD28 – zależną kostymulację limfocytów T [109, 148]. W wyniku tego działania zahamowaniu ulega aktywacja limfocytów T, a w konsekwencji aktywacja i proliferacja limfocytów B i produkcja przeciwciał. Lek również wywiera hamujący wpływ na inne komórki odpowiedzi immunologicznej (makrofagi, komórki prezentujące antygen, *Antigen Presenting Cells* – APC) [56, 94, 141]. Abatacept obecnie jest w okresie badań klinicznych. W najbliższej przyszłości dowiemy się więcej o jego efektywności w leczeniu *lupus nephritis*, reumatoidalnego zapalenia stawów czy wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Lek podaje się we wlewach dożylnych, średnio raz w miesiącu przez okres roku, łącznie ze steroidami oraz mykofenolanem mofetilu.

Lek może powodować wystąpienie reakcji z nadwrażliwości, suche zapalenie spojówki, zwiększa zapadalność na infekcje. Istnieje prawdopodobieństwo, że abatacept zwiększa ryzyko rozwoju nowotworów, co będzie dopiero można potwierdzić po wielu latach leczenia i obserwacji klinicznej.

Rituksymab stosowany jest od wielu lat w leczeniu chłoniaków, ze szczególnym wskazaniem na limfoproliferacyjną chorobę po przeszczepieniu narządów (PTLD). Jest to mysio-ludzkie chimeryczne monoklonalne przeciwciało, łączące się z antygenem CD20 na powierzchni limfocytów B i w efekcie prowadzi to do zmniejszenia ich proliferacji i aktywacji. Rituksymab był podawany u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów, kriglobulinemią oraz układowymi zapaleniami naczyń [24, 92, 144, 158]. Zastosowanie leku w leczeniu nefropatii toczniowej w chwili obecnej jest w okresie badań klinicznych [24]. Opublikowano kilka wstępnych badań [27, 42, 107, 112, 118, 159]. Jak na razie leczonych było niewielu chorych, chociaż wyniki leczenia wydają się być zachęcające. Efekt immunosupresyjny rituksymabu wynika z jego wpływu na limfocyty B, których liczba w czasie terapii ulega obniżeniu [27, 146]. Może to być przyczyną występowania powikłań infekcyjnych, szczególnie u chorych poddawanych wieloletniej terapii immunosupresyjnej.

Epratuzumab jest to humanizowane monoklonalne przeciwciało antiCD22, które w przeciwieństwie do rituksymabu, nie zmniejsza liczby limfocytów B, ale moduluje ich nadmierną aktywność [94, 140, 146]. W wyniku zastosowania leku dochodzi do spadku produkcji przeciwciał, a w konsekwencji do zmniejszenia aktywności choroby układowej. Jak na razie leczono tylko pojedynczych pacjentów, z dobrym efektem klinicznym [65, 95]. O tym czy lek znajdzie zastosowanie w terapii nefropatii toczniowej, będzie można powiedzieć dopiero po przeprowadzeniu dokładnych badań klinicznych.

Belimumab – ludzkie monoklonalne przeciwciało blokujące czynnik stymulujący limfocyty B - BLyS był oceniany w wieloośrodkowym badaniu klinicznym, a terapii poddano chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów i nefropatią toczniową [20, 47, 94, 146]. W badaniach doświadczalnych lek obniżał liczbę limfocytów B, a w konsekwencji obserwowano spadek produkcji przeciwciał przeciwnądrowych i zmniejszenie aktywności choroby [82, 124, 163]. Obserwowano także wzrost stężenia składowych dopełniacza. Podawanie belimumabu powodowało obniżenie stężenia immunoglobulin G i M, co oceniano jako działanie niepożądane leku. Badanie przedwcześnie przerwano z powodu powikłań infekcyjnych.

W okresie badań są m.in. leki: ocrelizumab – humanizowane monoklonalne przeciwciało antyCD20 [61, 94, 145, 146]; tocilizumab – humanizowane monoklonalne przeciwciało przeciw receptorowi dla interleukiny 6 [61, 145].

1.4. Ogólne zalecenia w leczeniu nefropatii toczniowej

Dopiero za kilka lat wiedza na temat terapii biologicznej w leczeniu *lupus nephritis* będzie powiększona o wyniki kilku badań wieloośrodkowych. Nie wydaje się jednak, że możliwe będzie znalezienie jednego efektywnego leku w terapii. Prawdopodobnie będą podawane różne leki immunosupresyjne i leczenie będzie dobierane indywidualnie do chorego. W przypadku nefropatii toczniowej wpływ na rodzaj zastosowanej terapii będzie miał wynik badania biopsyjnego nerki – co też czyni się obecnie, ale nie tylko to. Bardzo ważna będzie ocena innych parametrów, charakteryzujących aktywność choroby układowej z jednej strony, a z drugiej strony - stan immunologiczny chorego i współistniejące zaburzenia odporności, będące wynikiem wieloletniej immunosupresji.

W chwili obecnej cyklofosfamid pozostaje najbardziej efektywnym lekiem w terapii nefropatii toczniowej, a zwłaszcza ciężkich jej postaci. Jako lek z grupy cytostatyków posiada wiele działań ubocznych, dlatego ważne jest, by nie stosować leku w sytuacjach, kiedy może okazać się nieefektywny czy wręcz toksyczny. Z cyklofosfamidem jako lekiem podawanym od około trzydziestu lat posiadamy ogromne doświadczenie kliniczne. Cyklofosfamid jest nadal lekiem bardzo dobrym w leczeniu nefropatii toczniowej, zatem ważne jest byśmy dokładnie poznali wskazania do jego podawania oraz sposób monitorowania leczenia, oparty na rzetelnych badaniach doświadczalnych i klinicznych.

2. CEL

Celem głównym podjętych badań było poszukiwanie laboratoryjnych wskaźników, pozwalających przewidzieć skuteczność leczenia cyklofosfamidem u chorych z nefropatią toczniową.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ustalenie wskaźników prognostycznych przydatnych w ocenie efektywności leczenia cyklofosfamidem u pacjentów z nefropatią toczniową, potwierdzoną badaniem histopatologicznym.
2. Określenie przydatności wybranych wskaźników do oceny przebiegu leczenia oraz szans uzyskania remisji choroby.
3. Ocenę efektu leczenia cyklofosfamidem chorych z nefropatią toczniową w perspektywie rocznej obserwacji.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał kliniczny

Materiał kliniczny stanowiła grupach 67 chorych z rozpoznąną nefropatią w przebiegu toczenia rumieniowatego układowego (SLE). Wszyscy chorzy byli leczeni w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie między 1993 a 2008 rokiem. W badanej grupie było 56 kobiet i 11 mężczyzn, w wieku od 18 do 71 lat, średni wiek wynosił $35,8 \pm 13,4$ lat. U wszystkich badanych rozpoznano SLE, opierając się na kryteriach *American College of Rheumatology*. W tabeli 3 przedstawiono kryteria rozpoznania choroby układowej zgodnie z zaleceniami ACR. Obecność co najmniej czterech z jedenastu kryteriów pozwalała na postawienie rozpoznania toczenia rumieniowatego układowego.

Tabela 3. Kryteria rozpoznania toczenia rumieniowatego układowego zgodnie z zaleceniami *American College of Rheumatology*

Table 3. *The American College of Rheumatology diagnostic criteria of systemic lupus erythematosus*

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Zmiany rumieniowe na twarzy 2. Zmiany rumieniowo-bliznowaciejące 3. Nadwrażliwość na światło słoneczne 4. Nadżerki na błonach śluzowych jamy ustnej 5. Bóle i zmiany zapalne stawów 6. Zapalenie błon surowiczych 7. Zmiany w nerkach (białkomocz, erytrocyturia) 8. Zmiany neurologiczne 9. Zmiany hematologiczne: <ul style="list-style-type: none"> – niedokrwistość hemolityczna – leukopenia $<4,0$ G/l – limfopenia $<1,5$ G/l – trombocytopenia < 100 tys./mm³ 10. Zaburzenia immunologiczne: <ul style="list-style-type: none"> – obecność komórek LE – obecność przeciwciał przeciw natywnemu DNA – obecność przeciwciał przeciw Sm – fałszywie dodatnie klasyczne serologiczne odczyny kiłowe 11. Obecność podwyższonego miana przeciwciał przeciwjądrowych |
|---|

U wszystkich badanych postawiono rozpoznanie nefropatii toczeniowej w oparciu o obecność zmian w moczu: białkomoczu powyżej 0,5g na dobę i/lub krwiomoczu (krwinkomoczu) powyżej 5 erytrocytów w polu widzenia w badanym osadzie

moczu. Ponadto rozpoznanie nefropatii toczniowej było potwierdzone badaniem biopsyjnym nerki u większości badanych. Biopsję nerki wykonano u 63 chorych, natomiast u 4 chorych zaistniały przeciwwskazania do jej przeprowadzenia.

Przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem, badani pacjenci otrzymywali leczenie steroidami w postaci dożylnych pulsów metylprednizolonu (Solu-Medrol, Pharmacia & Upjohn) w dawce 1,0 g dziennie w ciągu kolejnych trzech dni, a następnie podawano prednizon (Encorton, Polfa Pabianice) doustnie w dawce 0,5 – 1 mg/kg masy ciała. W okresie trwania leczenia dawkę steroidów doustnych zmniejszano, by po sześciu miesiącach chory otrzymywał około 15 – 20 mg prednizonu na dobę. U chorych z upośledzoną funkcją nerek dawkę steroidów dożylnych obniżano proporcjonalnie do wielkości filtracji kłębuszkowej (GFR) i zwykle podawano dożylnie trzy pulsy metylprednizolonu w dawce dobowej 0,5 g (łącznie 1,5 g metylprednizolonu).

Charakterystykę badanej grupy chorych przed rozpoczęciem leczenia pulsami cyklofosfamidu przedstawiono poniżej [tabela 4].

Tabela 4. Charakterystyka badanych pacjentów przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem

Table 4. Characteristics of the study patients at the beginning of cyclophosphamide treatment

Liczba badanych <i>Number of patients</i>	67 osób
Płeć: kobiety / mężczyźni <i>Sex: women / men</i>	56 / 11
Wiek: średnia ± SD <i>Age: mean ± SD</i>	35,8 ± 13,4 lat
Zakres / Range	18–71 lat
Białkomocz: <i>Urine protein:</i> nienerczykowy <i>non nephrotic</i> nerczykowy <i>nephrotic</i>	14 pacjentów (21%) 53 pacjentów (79%)
Proteinuria <i>Proteinuria</i> średnia ± SD <i>mean ± SD</i> Zakres / Range	5,5 ± 3,2 g/24 h 1,2 – 16 g/24 h
Rozpoznanie biopsyjne <i>Renal biopsy findings</i> Nefropatia toczniowa: <i>Lupus nephritis:</i> klasa III WHO (<i>class III WHO</i>) klasa IV WHO (<i>class IV WHO</i>) klasa V WHO (<i>class V WHO</i>)	63 pacjentów 8 pacjentów 53 pacjentów 2 pacjentów

Kreatynina w surowicy: <1,2 mg/dl <i>Serum creatinine:</i> 1,3 - 2,0 mg/dl 2,1 - 3,0 mg/dl > 3,0 mg/dl	41 pacjentów 15 pacjentów 7 pacjentów 4 pacjentów
Erytrocyturia > 5 wpw <i>Erythrocyturia > 5 hpf</i>	67 pacjentów

wpw – w polu widzenia, *highpower field*, *hpf*

Wielkość białkomoczu dobowego w badanej grupie zawierała się pomiędzy 1,2 g do 16 g, przy średniej wartości - $5,5 \pm 3,2$ g/24 h. U 53 (79%) badanych rozpoznawano zespół nerczycowy (ZN), natomiast u 14 (21%) proteinurię nie-nerczycową (NNP), u których białkomocz dobowy utrzymywał się poniżej 3,0 g, ale był powyżej 1,0 g na dobę. Dodatkowo u 26 (39%) badanych stwierdzano podwyższone stężenie kreatyniny w surowicy powyżej 1,2 mg/dl. W przypadku czterech chorych stężenie kreatyniny w surowicy było powyżej 3,0 mg/dl. W oparciu o badanie biopsyjne nerki, wykonane u 63 badanych rozpoznano: klasę III WHO nefropatii toczniowej – u 8 badanych, klasę IV WHO nefropatii toczniowej – u 53 badanych oraz klasę Vb WHO nefropatii toczniowej – u dwóch badanych.

3.1.1. Schemat leczenia dożylnymi pulsami cyklofosfamidu (CYC)

Wszyscy badani pacjenci otrzymywali leczenie w postaci dożylnych pulsów cyklofosfamidu (CYC), zgodnie z obowiązującym schematem leczenia nefropatii w przebiegu tocznia rumieniowatego układowego [12, 30, 64].

Przed podaniem cyklofosfamidu chorego nawadniano wlewami dożylnymi soli fizjologicznej w ilości 1000 ml oraz w celu zapobiegania krwotocznemu zapaleniu pęcherza moczowego podawano mesnę (Anti-Uron, Pliva, Kraków) w dawce 3 razy 200 mg i.v., w odstępach 0, 4, 8 godzin od podania wlewu CYC.

Cyklofosfamid (Endoxan, Baxter-Oncology) podawano parenteralnie w dawce 0,75 g/m² powierzchni ciała, ale nie więcej niż 1,0 g na dawkę, jeden raz w miesiącu przez okres sześciu miesięcy, a następnie co trzy miesiące. U pacjentów z nieprawidłową funkcją nerek i z obniżonym GFR dawkę leku modyfikowano do ilości 0,25-0,5 g/m² powierzchni ciała w zależności od wielkości GFR oznaczanego jako klirens kreatyniny endogennej lub GFR wyliczano według wzoru Cocroft – Goult'a, a od 2007 roku - według skróconego wzoru MDRD. Comiesięczne leczenie pulsami CYC przez okres pół roku było leczeniem zasadniczym nefropatii toczniowej.

Faza druga leczenia - rodzaj terapii podtrzymującej, w przypadku pozytywnej reakcji na leczenie zasadnicze cyklofosfamidem, polegała na:

1. Podawaniu CYC w postaci dożylnych pulsów co 3 miesiące;
2. Konwersji do azatiopryny;
3. Konwersji do cyklosporyny .

Natomiast w przypadku braku reakcji na leczenie CYC w okresie pierwszych sześciu miesięcy:

1. Kontynuowano podawanie CYC parenteralnie do 8, 9 dawek a następnie co trzy miesiące lub
2. Konwertowano do mykofenolanu mofetilu (Cell-Cept, ROCHE)

3.1.2. Leczenie dodatkowe

Oprócz leczenia immunosupresyjnego chorzy, u których rozpoznawano nadciśnienie tętnicze otrzymywali leki hipotensyjne. Dawkowanie leków było uzależnione od obserwowanych wartości ciśnienia tętniczego. Spośród grup leków hipotensyjnych badani otrzymywali: inhibitory enzymu konwertującego (51 pacjentów), antagoniści wapnia (16 pacjentów), betablokery (24 pacjentów), blokery receptora alfa (7 pacjentów). W czasie trwania terapii CYC, zarówno rodzaj leku czy dawkowanie mogły ulegać zmianie, co związane było bezpośrednio z leczeniem, np. redukcja nadciśnienia tętniczego w okresie remisji choroby czy progresja nadciśnienia tętniczego w grupie chorych niereagujących na leczenie.

Dodatkowo stosowano profilaktykę zmian kostnych w postaci podawania preparatów wapnia i witaminy D₃, a w późniejszych latach niektórzy pacjenci otrzymywali bisfosfoniany.

W zależności od ciężkości zaburzeń lipidowych pacjenci przyjmowali leczenie statynami. W przypadku uzyskania remisji nefropatii toczniowej, której towarzyszyło cofanie się zaburzeń gospodarki lipidowej, leczenia tego nie kontynuowano.

3.1.3. Monitorowanie leczenia pulsami cyklofosfamidu

W pierwszym okresie prowadzenia leczenia pulsami cyklofosfamidu w badanej grupie wykonywano badania laboratoryjne w celu oceny efektywności terapii. Krew oraz mocz (dobowa zbiórka moczu i mocz poranny) na badania pobierano przed rozpoczęciem leczenia – czas zero, a następnie w dniu tuż przed podaniem kolejnej dawki leku dożylnie. W odstępach comiesięcznych wykonywano:

- badanie morfologiczne krwi
- stężenie kreatyniny w surowicy
- dobowe wydalanie białka z moczem
- klirens kreatyniny endogennej
- badanie ogóle moczu wraz z oceną osadu.

Ponadto przed rozpoczęciem leczenia oraz w okresach trzymiesięcznych monitorowano u chorych parametry gospodarki białkowej i lipidowej, oznaczane w surowicy krwi:

- stężenie białka całkowitego i albuminy
- lipidogram.

Na początku leczenia – czas zero i po sześciu miesiącach oraz po zakończeniu leczenia wykonywano badania immunologiczne w surowicy chorego:

- poziomy przeciwciał przeciwjądrowych - ANA
- stężenie składowych dopełniacza: C3 i C4
- stężenia immunoglobulin klasy: A, G i M.

3.1.4. Podział grupy badawczej ze względu na efekt leczenia cyklofosfamidem

Leczenie aktywnej nefropatii toczniowej w postaci dożylnych pulsów cyklofosfamidu nie okazało się efektywne u wszystkich pacjentów. Zatem badaną grupę chorych ze względu na efektywność terapii immunosupresyjnej podzielono na dwie grupy:

- a) **RE** – reagujących na leczenie cyklofosfamidem
- b) **N-RE** – niereagujących na leczenie cyklofosfamidem.

Kryterium podziału na te dwie grupy stanowił spadek białkomoczu w okresie pierwszych sześciu miesięcy leczenia. Do grupy **RE** zakwalifikowano chorych, u których w okresie sześciomiesięcznej terapii CYC uzyskano **średni spadek białkomoczu dobowego o co najmniej 30%** w stosunku do wartości sprzed leczenia. Z kolei chorzy, u których w okresie sześciu miesięcy leczenia średni spadek białkomoczu **nie przekraczał 30%** w stosunku do wartości sprzed leczenia zakwalifikowano jako **N-RE**. Średni procentowy spadek białkomoczu dobowego wyliczono jako wartość średnią z sześciu miesięcy leczenia.

3.1.5. Charakterystyka chorych reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem

W grupie chorych reagujących (RE) na leczenie w porównaniu z grupą chorych niereagujących (N-RE) nie wykazano istotnych różnic w poszczególnych parametrach, charakteryzujących stan chorych, jak: wiek, masa ciała, czas trwania tocznia rumieniowatego czy choroby nerek, średnie ciśnienie tętnicze czy wielkość białkomoczu dobowego [tabela 5].

Tabela 5. Charakterystyka badanych pacjentów z podziałem na: reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem

Table 5. Characteristics of the study patients divided into two groups: responders (RE) and non responders (N-RE) on cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Cała grupa badana <i>All study group</i> <i>n=67</i>	Reagujący (RE) <i>Responders (RE)</i> <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders (N-RE)</i> <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
Płeć <i>Sex</i> Kobiety/mężczyźni <i>Women / Men</i>	56 / 11	41 / 6	15 / 5	
Wiek (lata) <i>Age (years)</i> Zakres / <i>Range</i>	35,8 ± 13,4 <i>18 – 71</i>	37,2 ± 13,9 <i>18 – 71</i>	32,6 ± 12,0 <i>18 – 68</i>	NS
Masa ciała (kg) <i>Body weight (kg)</i> Zakres / <i>Range</i>	64,1 ± 11,9 <i>45 – 90</i>	62,7 ± 11,0 <i>45 – 90</i>	67,6 ± 13,2 <i>46 – 90</i>	NS
Rozpoznanie kliniczne: <i>Clinical diagnosis:</i> NNP (%) ZN (%)	14 (21%) 53 (79%)	12 (26%) 35 (74%)	2 (10%) 18 (90%)	
Rozpoznanie biopsyjne: <i>Renal biopsy findings:</i> III WHO IV WHO Vb WHO	n = 63 8 43 2	n = 45 8 37 0	n = 18 0 16 2	
Proteinuria (g/24h) <i>Proteinuria (g/24h)</i> Zakres / <i>Range</i>	5,5 ± 3,2 <i>1,2 – 16,0</i>	5,2 ± 3,2 <i>1,2 – 16,0</i>	6,4 ± 3,2 <i>1,7 – 12,0</i>	NS
Czas trwania SLE (m-ce) <i>Duration of SLE (months)</i> Zakres / <i>Range</i>	53 ± 66 <i>1 – 314</i>	55 ± 72 <i>1 – 314</i>	51 ± 51 <i>1 – 169</i>	NS

Parametr <i>Parameter</i>	Cała grupa badana <i>All study group</i> <i>n=67</i>	Reagujący (RE) <i>Responders (RE)</i> <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders (N-RE)</i> <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
Czas trwania LN (m-ce) <i>Duration of LN (months)</i> Zakres / <i>Range</i>	33 ± 51 <i>1 – 288</i>	35 ± 57 <i>1 – 288</i>	26 ± 33 <i>1 – 114</i>	NS
MAP (mmHg) <i>MAP (mmHg)</i>	97,4 ± 9,3	96,5 ± 9,2	99,5 ± 9,5	NS

Wyniki badań przedstawiono jako średnia ± SD.

Values reported as mean ± SD.

NS – różnice statystycznie nieznamienne, *non statistically significant differences*

ZN – zespół nerczycowy, *nephrotic syndrome*

NNP – nienerczycowa proteinuria, *non nephrotic proteinuria*

3.2. Metody

3.2.1. Metody laboratoryjne

Wszystkie wymienione powyżej badania wykonywane było w Laboratorium Centralnym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przy użyciu wymienionych poniżej, a rutynowo stosowanych metod laboratoryjnych.

1) Badanie morfologiczne krwi obwodowej

Badanie morfologiczne krwi obwodowej wykonywano przy pomocy automatycznego analizatora hematologicznego (Sysmex XE-2100). Spośród wielu parametrów, które uzyskuje się z wyniku badania morfologii krwi wzięto pod uwagę: stężenie hemoglobiny, hematokryt (względna objętość procentowa erytrocytów) oraz liczbę krwinek białych i liczbę limfocytów.

2) Oznaczanie stężenie kreatyniny

Stężenie kreatyniny (mg/dl) w surowicy oznaczano przy użyciu metody kinetycznej według Fabiny'ego i Soldina (Creatinine, REF 7D64-20, Abbott CLINICAL CHEMISTRY).

3) Oznaczanie klirensu kreatyniny endogennej

Do oznaczenia klirensu kreatyniny endogennej konieczne było przeprowadzenie przez chorego dobowej zbiórki moczu w celu oceny wydalania kreatyniny z moczem oraz pobranie krwi na oznaczenie stężenia kreatyniny w surowicy.

Klirens kreatyniny endogennej (KL_{KR}) oznaczano w ml/min zgodnie z podanym wzorem:

$$KL_{KR} = \frac{U \times V}{S}$$

U – stężenie kreatyniny w moczu (mg/dl)

V – objętość moczu (ml/min)

S – stężenie kreatyniny w surowicy (mg/dl)

Wielkość filtracji kłębuszkowej (eGFR, *estimated glomerular filtration rate*) oceniano według wprowadzonego od 2007 roku, skróconego wzoru MDRD:

$$eGFR = 175 \times [P^{-1,154}] \times [W^{-0,203}] \times R$$

P – stężenie kreatyniny w surowicy w mg/dl

W – wiek pacjenta w latach

R – stały wskaźnik dla mężczyzn wynosi 1, dla kobiet wynosi 0,742

4) Oznaczanie dobowego wydalania białka z moczem

Dobowe wydalanie białka z moczem wykonywano ze zbiórki dobowej moczu przy użyciu metody turbidimetrycznej z użyciem chlorku benzetonium (Urine/CSF Protein, REF 7D79-20 and 7D79-30, Abbott CLINICAL CHEMISTRY)

5) Badanie ogólne moczu wraz z oceną osadu

Badanie ogólne moczu wykonywano z pierwszej porcji moczu oddanej rano przy użyciu pasków do analizy moczu (DIRUI, H10-800) a następnie osad po odwirowaniu próbki moczu oceniano przy pomocy analizatora – H-800 URINE ANALYZER. Wyniki badania liczby erytrocytów w osadzie moczu były podawane 5 zakresach: od 0 do 3 erytrocytów w polu widzenia (wpw), od 4 do 10 erytrocytów wpw, od 11 do 15 erytrocytów wpw, od 16 do 25 erytrocytów wpw i erytrocyty pokrywające pole widzenia. Erytrocyturię wyliczano jako średnia ilość erytrocytów w polu widzenia (wpw), natomiast dla wyniku osadu moczu - erytrocyty pokrywające pole widzenia przyporządkowano liczbę 30 erytrocytów w polu widzenia.

6) Oznaczanie stężenia białka całkowitego i albuminy

Stężenie białka całkowitego w surowicy chorego oznaczano metodą biuretową (Total Protein, REF 7D73-20, Abbott CLINICAL CHEMISTRY), natomiast stężenie albuminy w surowicy – metodą z użyciem zieleni bromokrezolowej (Albumin BCG, REF 7D53-20, Abbott CLINICAL CHEMISTRY).

7) Oznaczanie stężenia cholesterolu całkowitego i trójglicerydów

Stężenie cholesterolu całkowitego wykonywano przy użyciu metody immunoenzymatycznej (Cholesterol, REF 7D62-20, Abbott CLINICAL CHEMISTRY); natomiast stężenie trójglicerydów w surowicy - metody pomiarowej z wykorzystaniem oksydazy glicerolo-fosforanu (Triglyceride, REF 7D74-20, Abbott CLINICAL CHEMISTRY).

8) Oznaczanie stężenia składowych dopełniacza: C3 i C4.

Stężenie składowych dopełniacza: C3 i C4 wykonywano w surowicy chorego przy użyciu metody immunonefelometrycznej (N Antisera to Human Complement Factors [C3c, C4], SIEMENS).

9) Oznaczanie stężenia immunoglobulin klasy: A, G, M.

Stężenia immunoglobulin: klasy A (IgA), klasy G (IgG) i klasy M (IgM) w surowicy chorego wykonywano przy użyciu metody immunoturbidymetrycznej (Immunoglobulin A [REF 9D98-20], Immunoglobulin G [REF 9D99-20], Immunoglobulin M [REF 1E01-20], Abbott CLINICAL CHEMISTRY).

10) Oznaczanie przeciwciał przeciwjądrowych i przeciwciał przeciw DNA

Przeciwciała przeciwjądrowe (*anti-nuclear antibodies*, ANA) oceniano, wykorzystując metodę immunofluorescencji pośredniej. Jako substrat antygenowy używano tkanek zwierzęcych – wątroby szczura lub komórek Hep-2 [105].

3.2.2. Ocena morfologiczna biopsji nerki

Biopsja nerki wykonywana była w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a następnie materiał biopsyjny przekazywano do Katedry i Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Na wynik badania histopatologicznego bioptatu nerki składała się: ocena bioptatu w mikroskopie świetlnym (LM, *light*

microscope) i w mikroskopie immunofluorescencyjnym (IM, *immunfluorescent microscope*).

W oparciu o obraz morfologiczny biopsatu nerki w tych dwóch badaniach rozpoznawano typ nefropatii toczniowej zgodnie z klasyfikacją WHO z 1995 roku. Pomimo ukazania się nowej klasyfikacji nefropatii toczniowej ISN/RPS w 2003 roku posługiwano się nadal klasyfikacją WHO z 1995 roku, ponieważ znaczny procent badanych pacjentów był diagnozowany i leczony przed ukazaniem się nowej klasyfikacji nefropatii toczniowej. Zatem ważne było, by rozpoznanie nefropatii toczniowej u wszystkich badanych oparto o tą samą klasyfikację. Ponadto klasyfikacja nefropatii toczniowej ISN/RPS jest modyfikacją klasyfikacji WHO z 1995 roku.

3.2.3. Metody analizy statystycznej

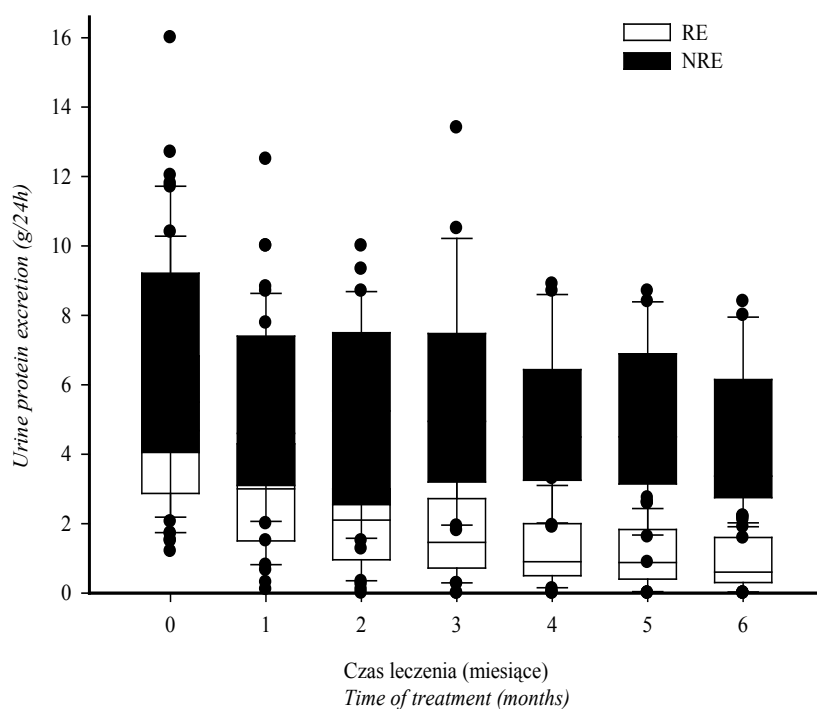
Analizę statystyczną przeprowadzono, posługując się programem komputerowym SIGMAPLOT.

Znamiennosć statystyczną przy porównywaniu dwóch rozkładów oceniano, posługując się testem parametrycznym t-Studenta lub nieparametrycznym testem U (Mann-Whitney'a).

4. WYNIKI BADAŃ

4.1. Ocena stanu pacjentów przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem

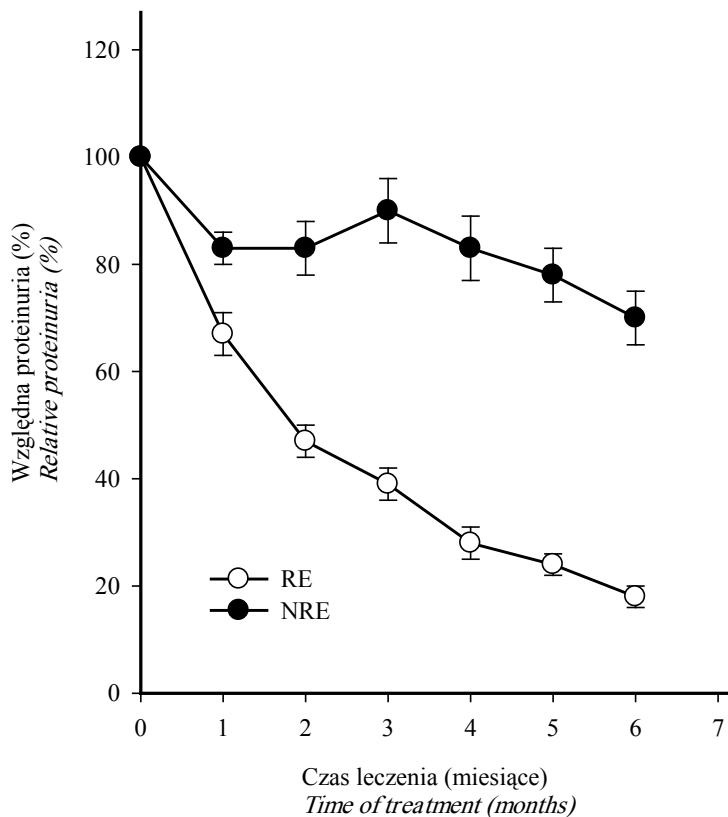
Wielkość białkomoczu dobowego oceniano w dwóch grupach chorych: reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem [rycina 1].



Rycina 1. Wielkość dobowego wydalania białka z moczem w dwóch grupach chorych reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem. Wyniki przedstawiono jako mediana i 1-y, 2-y, 3-y i 4-y kwantyl oraz \pm błąd standardowy średniej

Figure 1. 24-hour urine protein excretion in the two groups of patients: responders (RE) and non responders (N-RE) on cyclophosphamide treatment. Values are presented as median and 1st, 2nd, 3th, 4th quantile with standard error

W okresie sześciu miesięcy leczenia pulsami CYC w grupie pacjentów RE obserwowano ogromny, bo ponad 80% spadek wielkości proteinurii. W grupie pacjentów NRE wielkość białkomoczu dobowego zmniejszyła się w niewielkim stopniu, średnio około 20% wartości wyjściowych [rycina 2].



Rycina 2. Wielkość względnej proteinurii w dwóch grupach chorych reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem

Figure 2. Relative proteinuria in the two groups of patients responders (RE) and non responders (N-RE) on cyclophosphamide treatment

4.1.1. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie pacjentów reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem (CYC)

W tabeli 6 przedstawiono wyniki badań laboratoryjnych w grupie chorych RE i N-RE przed rozpoczęciem leczenia pulsami CYC. Stężenie kreatyniny, białka całkowitego, albuminy, cholesterolu czy trójglicerydów w surowicy krwi, jak i wielkość leukocytozy we krwi nie różniły się znamienne statystycznie pomiędzy obu badanymi grupami. Nie obserwowano również istotnych różnic w wielkości klirensu kreatyniny. Zaobserwowano jedynie nieco niższe stężenie hemoglobiny we krwi w grupie pacjentów RE. Spośród badań moczu najwyraźniej uwidoczniła się różnica w wielkości erytrocyturii, która jest niemal dwukrotnie mniejsza w grupie pacjentów niereagujących (N-RE).

Tabela 6. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów przed leczeniem cyklofosfamidem

Table 6. Laboratory values of the study patients before cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
Kreatynina w surowicy <i>Serum</i> <i>creatinine</i>	mg/dl	1,41 ± 0,12	1,46 ± 0,21	NS
Klirens kreatyniny <i>Creatinine</i> <i>clearance</i>	ml/min	69,1 ± 3,9	66,8 ± 5,8	NS
Hemoglobina we krwi <i>Blood</i> <i>Hemoglobin</i>	g/dl	11,4 ± 0,2	12,5 ± 0,4	<0,05
Leukocytoza we krwi <i>White Blood</i> <i>Cells Count</i>	G/l	9,1 ± 0,4	10,1 ± 0,6	NS
Białko całkowite w surowicy <i>Serum Total</i> <i>Protein</i>	g/dl	5,9 ± 0,1	5,5 ± 0,2	NS

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
Albumina w surowicy <i>Serum Albumin</i>	g/dl	3,2 ± 0,1	2,9 ± 0,2	NS
Cholesterol w surowicy <i>Serum Cholesterol</i>	mg/dl	256 ± 11	316 ± 28	NS
Trójglicerydy w surowicy <i>Serum Triglycerides</i>	mg/dl	204 ± 14	251 ± 36	NS
Białko w moczu <i>Urine protein</i>	g/24 h	5,2 ± 0,4	6,4 ± 0,7	NS
Erytrocyturia <i>Erythrocyturia</i>	liczba/wpw <i>number/hpf</i>	17,9 ± 1,2	11,4 ± 1,4	<0,01

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE.

Values reported as mean ± SE.

wpw – w polu widzenia

hpf – high power field

Znacznie silniej zaznaczone różnice ujawniły się w badaniach immunologicznych. W grupie chorych niereagujących (N-RE) obserwowano wyraźnie niższe miano przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) oraz niższe stężenie immunoglobuliny G (IgG) w surowicy. Natomiast stężenie składowej dopełniacza C3 było niższe w grupie pacjentów reagujących (RE), ale różnica nie była znamienne statystycznie. Stężenia immunoglobulin: M (IgM) i A (IgA) nie różniły się statystycznie znamienne pomiędzy obu badanymi grupami chorych [tabela 7].

Tabela 7. Wyniki badań immunologicznych badanych pacjentów przed leczeniem cyklofosfamidem

Table 7. Serology tests of the study patients before cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
IgA w surowicy <i>Serum IgA</i>	g/l	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,4	NS
IgG w surowicy <i>Serum IgG</i>	g/l	11,6 ± 0,8	9,0 ± 0,8	<0,05
IgM w surowicy <i>Serum IgM</i>	g/l	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	NS
C3 w surowicy <i>Serum C3</i>	g/l	0,63 ± 0,03	0,74 ± 0,05	<0,07
C4 w surowicy <i>Serum C4</i>	g/l	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	NS
ANA w surowicy <i>Serum ANA</i>	miano <i>titer</i>	1620 ± 140	740 ± 190	<0,002

Wyniki podano jako średnia ± SE z n badań.

Values reported as mean ± SE.

4.1.2. Ocena stanu pacjentów z uwzględnieniem wielkości dobowego wydalania białka z moczem

W dwóch badanych grupach chorych RE i N-RE przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem zakres wielkości białkomoczu dobowego był bardzo szeroki i wynosił u pacjentów RE: od 1,2 -16,0 g na dobę, a w przypadku grupy chorych N-RE: od 1,7 -12,03 g, co w znacznym stopniu utrudniało ocenę dynamiki zmiany dobowego wydalania białka z moczem w czasie leczenia. W celu uniezależnienia się od wielkości proteinurii oraz poszukiwania wskaźników najbardziej te dwie grupy różniących, dokonano podziału na cztery podgrupy, kierując się wielkością białkomoczu dobowego przed rozpoczęciem leczenia [tabela 8].

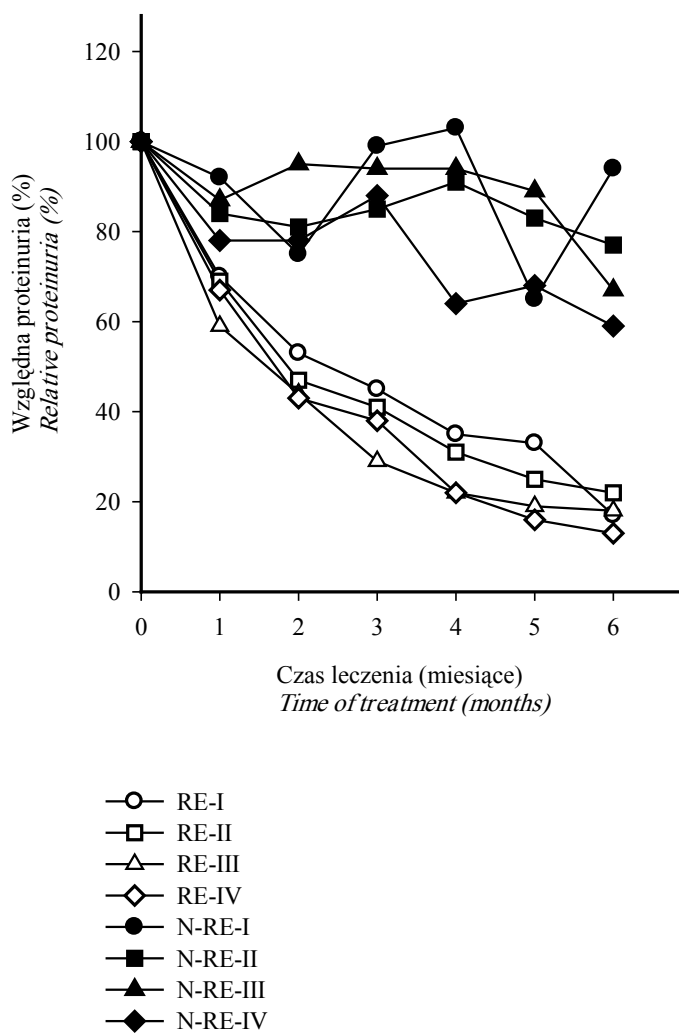
Tabela 8. Podział pacjentów leczonych cyklofosfamidem na cztery podgrupy w zależności od wielkości białkomoczu dobowego

Table 8. Four subgroups of the cyclophosphamide treated patients depending on 24-hour urine protein excretion

Wydalenie białka z moczem (g/24 h) <i>Urine protein excretion (g/24 h)</i>	Liczba badanych <i>Number of patients</i>	
	Reagujący (RE) <i>Responders</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i>
Podgrupa I: [1 – 2,9 g] <i>Subgroup I: [1-2,9 g]</i>	12	2
Podgrupa II: [3 – 5 g] <i>Subgroup II: [3-5 g]</i>	17	6
Podgrupa III: [5,1 – 7 g] <i>Subgroup III: [5,1-7 g]</i>	9	5
Podgrupa IV: [>7 g] <i>Subgroup IV: [>7 g]</i>	9	7

We wszystkich czterech podgrupach pacjentów RE, niezależnie od wielkości białkomoczu dobowego, obserwowano wyraźny procentowy względny spadek proteinurii w okresie sześciu miesięcy leczenia. Po szóstym miesiącu terapii wynosił on średnio około 20% wartości wyjściowej. W podgrupach chorych N-RE nie obserwowano istotnych zmian lub tylko niewielki spadek białkomoczu dobowego [rycina 3].

Pomiędzy badanymi czterema podgrupami pacjentów RE i N-RE na leczenie cyklofosfamidem nie stwierdzono istotnych różnic w wielkości proteinurii, stężeniu kreatyniny, cholesterolu całkowitego i trójglicerydów [tabela 9]. W przypadku oznaczanego klirensu kreatyniny endogennej, tylko między podgrupą II wśród chorych RE i N-RE stwierdzono statystycznie znamiennej różnicę, gdzie wyższe wartości obserwowano u pacjentów RE. Natomiast wyraźne różnice obserwowano w wielkości erytrocyturii, mierzonej jako średnia ilość erytrocytów w polu widzenia. We wszystkich podgrupach chorych N-RE obserwowano niższe wartości erytrocyturii, przy czym w podgrupie III była to różnica znamiennej statystycznie.



Rycina 3. Zmiany w wielkości względnej proteinurii badanych pacjentów w czasie sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem

Figure 3. Changes in relative proteinuria in the study patients during the six months period of cyclophosphamide treatment

Tabela 9. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem

Table 9. Laboratory values in the study patients before cyclophosphamide treatment

Parametr Parameter	Pod- grupa Sub- group	Grupy badane Study groups		P RE vs N-RE
		RE	N-RE	
Kreatynina w surowicy (mg/dl) <i>Serum Creatinine</i> (mg/dl)	I	1,41 ± 0,16	[0,6] [0,77]	NS NS NS
	II	1,13 ± 0,12	2,12 ± 0,60	
	III	1,20 ± 0,14	1,28 ± 0,14	
	IV	2,16 ± 0,63	1,28 ± 0,13	
Klirens kreatyniny (ml/min) <i>Creatinine Clearance</i> (ml/min)	I	56,6 ± 7,1	[101] [120]	<0,05 NS NS
	II	83,7 ± 8,0	45,8 ± 7,9	
	III	67,4 ± 8,4	72,6 ± 10,9	
	IV	58,1 ± 12,1	68,2 ± 6,4	
Cholesterol w surowicy (mg/dl) <i>Serum Cholesterol</i> (mg/dl)	I	208 ± 11	[225] [243]	NS NS NS
	II	240 ± 19	264 ± 19	
	III	277 ± 22	301 ± 82	
	IV	328 ± 22	372 ± 41	
Trójglicerydy w surowicy (g/dl) <i>Serum Triglycerides</i> (mg/dl)	I	172 ± 31	[175] [288]	NS NS NS
	II	214 ± 29	214 ± 29	
	III	215 ± 24	155 ± 45	
	IV	228 ± 16	351 ± 77	
Białko w moczu (g/24 h) <i>Urine Protein</i> [g/24 h]	I	2,0 ± 0,2	[2,05] [1,7]	NS NS NS
	II	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2	
	III	6,1 ± 0,2	5,8 ± 0,2	
	IV	10,5 ± 0,2	10,1 ± 0,6	
Erytrocyturia (liczba/wpw) <i>Erythrocyturia</i> (number/hpf)	I	18,1 ± 3,3	[5] [13]	NS <0,05 NS
	II	16,2 ± 2,2	10,8 ± 2,3	
	III	18,7 ± 2,5	9,8 ± 2,5	
	IV	20,2 ± 3,5	13,6 ± 3,1	

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE z n badań podanych w tabeli 8. W nawiasach kwadratowych podano wyniki poszczególnych badań.

Values are mean ± SE from n examinations presented in table 8. Values of the two patients study are given in square brackets.

wpw – w polu widzenia, hpf – high power field

Nie obserwowano wyraźnych różnic w stężeniach albuminy, białka całkowitego, globulin oraz IgG i IgM w surowicy pomiędzy podgrupami pacjentów RE i N-RE w momencie rozpoczęcia leczenia cyklofosfamidem [tabela 10]. Jedyne w podgrupie II wykazano różnicę zmienną statystycznie w stężeniu białka

całkowitego i globulin w surowicy pomiędzy chorymi N-RE i RE. Wartości wyższe obserwowano u chorych RE. Natomiast wyraźne różnice uwidoczniły się pomiędzy badanymi podgrupami w wielkości miana przeciwciał przeciwjadowych (ANA) oraz stężenia składowej C3 dopełniacza. W podgrupach chorych N-RE stwierdzano niższe miano ANA oraz wyraźnie wyższe stężenie C3, które w podgrupie IV było znamienne statystycznie.

Tabela 10. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem

Table 10. Laboratory values in the patients study before cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Pod- grupa <i>Sub- group</i>	Grupy badane <i>Study groups</i>		P RE vs N-RE
		RE	N-RE	
Białko całkowite w surowicy (g/dl) <i>Serum Total Protein (g/dl)</i>	I	6,2 ± 0,2	[6,3] [6,6]	<0,01 NS NS
	II	6,4 ± 0,2	5,2 ± 0,2	
	III	5,4 ± 0,3	6,1 ± 0,5	
	IV	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,5	
Albumina w surowicy (g/dl) <i>Serum Albumin (g/dl)</i>	I	3,4 ± 0,2	[4,0] [2,5]	NS NS NS
	II	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,2	
	III	2,9 ± 0,2	3,1 ± 0,4	
	IV	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,3	
Globuliny w surowicy (g/dl) <i>Serum Globulins (g/dl)</i>	I	2,8 ± 0,1	[2,3] [4,1]	<0,05 NS NS
	II	3,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	
	III	2,4 ± 0,2	3,1 ± 0,4	
	IV	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,4	
IgG w surowicy (g/l) <i>Serum IgG (g/l)</i>	I	12,4 ± 1,1	[11,4] [15,6]	NS NS NS
	II	13,8 ± 1,4	9,0 ± 1,4	
	III	10,3 ± 2,1	9,5 ± 1,9	
	IV	8,6 ± 1,0	7,4 ± 1,1	
IgM w surowicy (g/l) <i>Serum IgM (g/l)</i>	I	0,8 ± 0,1	[0,6] [1,1]	NS NS NS
	II	1,5 ± 0,4	1,1 ± 0,2	
	III	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,6	
	IV	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,3	
ANA w surowicy [miano] <i>Serum ANA [titer]</i>	I	2190 ± 200	[2560] [2560]	NS NS <0,05
	II	1640 ± 230	800 ± 400	
	III	1320 ± 410	390 ± 120	
	IV	1100 ± 290	420 ± 110	

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE z n badań podanych w tabeli 8. W nawiasach kwadratowych podano wyniki poszczególnych badań.

Values are mean ± SE from n examinations presented in table 8. Values of the two patients study are given in square brackets.

Przedstawione wyniki wskazują, że w podgrupach chorych RE wzrostowi dobowego białkomoczu towarzyszył wyraźny spadek stężenia białka całkowitego, albuminy, globulin oraz IgG w surowicy. Natomiast w przypadku chorych N-RE, tego typu zaburzeń nie obserwowano.

Ocena hematologiczna badanych pacjentów nie wykazała znaczących różnic pomiędzy chorymi N-RE i RE w podgrupach o niskim i średnim wydalaniu białka z moczem (podgrupy I, II, III). Jedynie w podgrupie IV- z dużą proteinurią, obserwowano statystycznie znamienne wyższe wartości stężenia hemoglobiny, wielkości hematokrytu oraz limfocytozy u chorych NRE [tabela 11].

Tabela 11. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem

Table 11. Laboratory values in the study patients before cyclophosphamide treatment

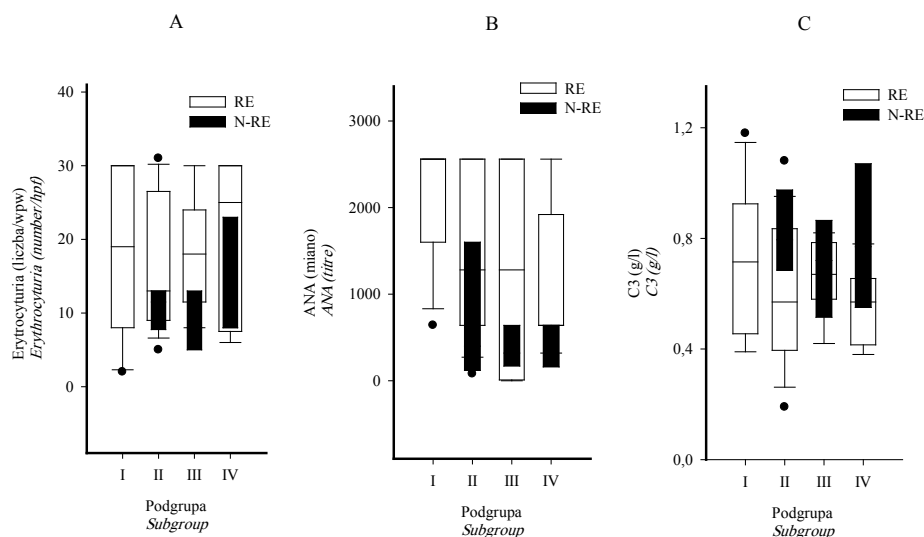
Parametr <i>Parameter</i>	Pod- grupa Sub- group	Grupy badane <i>Study groups</i>		P RE vs N-RE
		RE	N-RE	
Hemoglobina we krwi (g/dl) <i>Blood Hemoglobin (g/dl)</i>	I	12,1 ± 0,5	[11,5] [10,7]	NS NS <0,01
	II	11,2 ± 0,5	12,3 ± 0,7	
	III	11,9 ± 0,5	12,9 ± 1,2	
	IV	10,4 ± 0,6	12,8 ± 0,6	
Hematokryt we krwi [%] <i>Blood Haematocrit [%]</i>	I	34,9 ± 0,9	[34,4] [33,3]	NS NS <0,05
	II	33,7 ± 1,3	37,0 ± 2,3	
	III	35,5 ± 1,5	38,8 ± 4,0	
	IV	31,0 ± 1,7	38,1 ± 1,8	
Limfocyty we krwi [liczba/mm ³] <i>Blood Lymphocytes Count [number/mm³]</i>	I	1210 ± 230	[480] [710]	NS NS <0,05
	II	1440 ± 140	1290 ± 100	
	III	1690 ± 350	2150 ± 470	
	IV	980 ± 130	1820 ± 330	

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE z n badań podanych w tabeli 8. W nawiasach kwadratowych podano wyniki poszczególnych badań.

Values are mean ± SE from n examinations presented in table 8 Values of the two study patients are given in square brackets.

4.1.3. Ocena wyników badań odróżniających pacjentów reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem

Spśród wszystkich przeprowadzonych badań na szczególną uwagę zasługują trzy z nich: **wielkość erytrocyturii** oraz **wielkość miana przeciwciał ANA** i **stężenie składowej C3 dopełniacza** w surowicy krwi. W badaniach tych wyraźnie uwidoczniły się różnice pomiędzy pacjentami reagującymi (RE) a niereagującymi (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem [rycina 4].



Rycina 4. Wielkość erytrocyturii, miano przeciwciał ANA i stężenie składowej C3 dopełniacza badanych pacjentów przed leczeniem cyklofosfamidem. Wyniki przedstawiono jako mediana i 1-y, 2-y, 3-y i 4-y kwantyl oraz błąd standardowy średniej.

Figure 4. Erythrocyturia, titer of ANA and C3 complement level in the study patients before cyclophosphamide treatment. Values reported as median and 1st, 2nd, 3rd, 4th quantile with standard error.

Istnieje trudność w ocenie dwóch z tych parametrów: wielkość erytrocyturii oraz miano przeciwciał ANA. Wielkość erytrocyturii jest badaniem półilościowym - wyniki badania podaje się jako zakresy, które nie mają charakteru zależności liniowych. Natomiast kolejne miano przeciwciał ANA jest rozcieńczeniem poprzedniego, zatem uzyskane wyniki mają przebieg funkcji wykładniczej. Aby umożliwić opracowanie uzyskanych wyników i ułatwić ich interpretację, poszczególnym parametrom przypisano liniowo zależne wartości punktowe. Zasady przeliczania wielkości wydalania krwinek czerwonych z moczem oraz ocenę miana przeciwciał ANA przedstawia tabela 12.

Tabela 12. Ocena punktowa wielkości erytrocyturii i wielkości miana przeciwciał ANA
 Table 12. Point score of erythrocyturia and titer of ANA

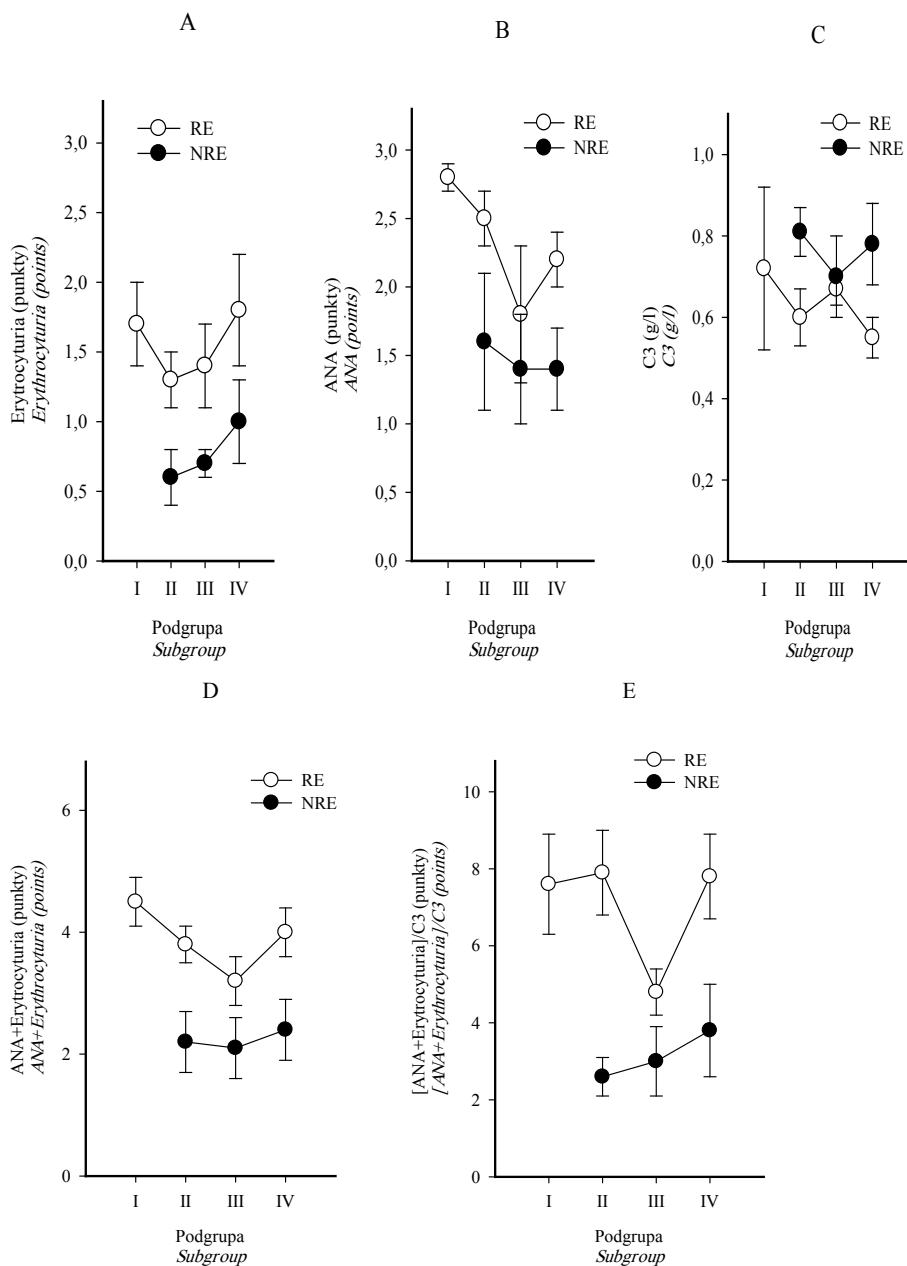
Wartość punktowa <i>Value of the point</i>	Erytrocyturia (liczba/wpw) <i>Erythrocyturia (number/hpf)</i>	ANA (miano) <i>ANA (titer)</i>
0	0 – 3	≤ 1 : 40
0,5	4 – 10	1 : 80
1	11 – 15	1 : 160
1,5		1 : 320
2	16 – 25	1 : 640
2,5		1 : 1280
3	pokrywające pole widzenia	1 : 2560 i powyżej

wpw – w polu widzenia, *hpf* – *high power field*

Wyliczone w ten sposób wyniki tych parametrów dla podgrup pacjentów RE i N-RE na leczenie przedstawiono odpowiednio na rycinie 5 A, B, C.

Pomiędzy podgrupami chorych RE i N-RE zaobserwowano wyraźne różnice w wielkości erytrocyturii, mierzonej wskaźnikiem Ecyt. Zdecydowanie niższe wartości wskaźnika Ecyt były u chorych N-RE, a w podgrupie II różnica była znamienna statystycznie. Podobnie wyraźne różnice pomiędzy podgrupami chorych RE i N-RE obserwuje się, porównując wskaźnik ANA. Zdecydowanie niższe wartości wskaźnika ANA stwierdzano w podgrupach chorych N-RE. Pomiędzy podgrupami II i IV uzyskano różnicę znamieną statystycznie. Stężenie składowej C3 dopełniacza w surowicy było wyższe u chorych N-RE na leczenie. W podgrupie z wysokim białkomoczem dobowym różnica była statystycznie znamienna, natomiast pomiędzy podgrupami II i III chorych RE i N-RE różnice nie okazały się tak wyraźne lub były niewielkie (podgrupa III).

Wyniki te wskazują, że dobrymi parametrami odróżniającymi chorych N-RE od RE jest wielkość erytrocyturii oraz miano ANA. W celu poszukiwania parametrów, które jeszcze lepiej odróżniałyby grupę chorych RE od N-RE połączono oba wskaźniki w postaci sumy ANA+Ecyt [rycina 5 D]. Sumaryczny wskaźnik ANA+Ecyt jeszcze lepiej odróżniał dwie grupy badanych RE i N-RE. W przypadku podgrup II i IV uzyskano różnice znamienne statystyczne, a pomiędzy podgrupą III wynik był na granicy znamienności statystycznej ($p < 0,1$).



Rycina 5. Ocena punktowa wielkości erythrocyturii, miana przeciwciał ANA oraz stężenie składowej C3 dopełniacza w podgrupach chorych RE i N-RE przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem

Figure 5. Point score of erythrocyturia and titer of ANA and C3 complement level in the RE and N-RE subgroups of patients before cyclophosphamide treatment

Sprawdzono też czy uwzględnienie także wielkości stężenia C3 dopełniacza jeszcze bardziej odróżniałoby grupę chorych RE od N-RE. Wskaźnik ten jest sumą wielkości erytrocyturii i miana przeciwciał ANA podzieloną przez stężenie składowej C3 dopełniacza, czyli $[ANA+Ecyt]/C3$ [rycina 5 E].

Wynik porównania wskaźnika $[ANA+Ecyt]/C3$ pomiędzy chorymi RE i N-RE okazał się podobny do wyniku otrzymanego przy ocenie wskaźnika ANA+Ecyt. Pomędzy podgrupami II i IV uzyskano różnice znamienne statystycznie. Jednak w obrębie podgrup III różnica ta była wyraźniej statystycznie nieznamieniana ($p < 0,2$). Podsumowaniem tych obserwacji są wyniki zbiorcze przedstawione w tabeli 13. Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że wskaźnikami najlepiej odzwierciedlającymi różnice pomiędzy chorymi N-RE a RE jest suma wskaźników ANA+Ecyt oraz każdy z tych wskaźników osobno.

Tabela 13. Wyniki badań wskaźników: erytrocyturia (Ecyt), wskaźnika ANA (ANA), stężenia składowej C3 dopełniacza (C3), ANA+Ecyt oraz $[ANA+Ecyt]/C3$ badanych pacjentów przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem

Table 13. Results of the markers: erythrocyturia (Ecyt), ANA (ANA) and C3 complement level, ANA+Ecyt and $[ANA+Ecyt]/C3$ of the study patients before cyclophosphamide treatment

Wskaźnik Marker	Reagujący (RE) Responders (RE) n=47	Niereagujący (N-RE) Non responders (N-RE) n=20	P RE vs N-RE
ANA (punkty) ANA (points)	1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	<0,004
Ecyt (punkty) Ecyt (points)	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2	<0,001
C3 w surowicy (g/l) Serum C3 (g/l)	0,63 ± 0,03	0,74 ± 0,05	<0,07
ANA+Ecyt (punkty) ANA+Ecyt (points)	4,1 ± 0,2	2,6 ± 0,3	<0,001
$[ANA+Ecyt]/C3$ (punkty) $[ANA+Ecyt]/C3$ (points)	7,7 ± 0,6	3,9 ± 0,6	<0,001

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE.

Values reported as mean ± SE.

4.2. Ocena efektu leczenia cyklofosfamidem u pacjentów okresie pierwszych sześciu miesięcy terapii

4.2.1. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów w okresie sześciomiesięcznego leczenia cyklofosfamidem

Oceniając wyniki podstawowych badań laboratoryjnych po trzech miesiącach leczenia cyklofosfamidem [tabela 14] zaobserwowano znaczącą różnicę w wielkości dobowego wydalania białka z moczem pomiędzy pacjentami reagującymi (RE) i niereagującymi (N-RE). Towarzyszyły temu wyraźnie niższe stężenia białka całkowitego i albuminy w surowicy u chorych N-RE.

Tabela 14. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów po trzech miesiącach leczenia cyklofosfamidem

Table 14. Laboratory values of the study patients after three months of cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders (RE)</i> n=47	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) n=20	P RE vs N-RE
Kreatynina w surowicy <i>Serum</i> <i>Creatinine</i>	mg/dl	1,12 ± 0,05	1,35 ± 0,16	NS
Klirens kreatyniny <i>Creatinine</i> <i>Clearance</i>	ml/min	82,3 ± 7,9	71,7 ± 6,2	NS
Hemoglobina we krwi <i>Blood</i> <i>Hemoglobin</i>	g/dl	12,4 ± 0,3	13,3 ± 0,3	0,06
Limfocytoza we krwi <i>Blood</i> <i>Lymphocytes</i> <i>Count</i>	liczba/ mm ³ <i>number/</i> <i>mm³</i>	1580 ± 140	1660 ± 260	NS

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders (RE)</i> n=47	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) n=20	P RE vs N-RE
Białko całkowite w surowicy <i>Serum Total Protein</i>	g/dl	6,4 ± 0,1	5,8 ± 0,2	<0,003
Albumina w surowicy <i>Serum Albumin</i>	g/dl	3,8 ± 0,1	3,3 ± 0,1	<0,001
Białko w moczu <i>Urine Protein</i>	g/24 h	1,9 ± 0,2	5,6 ± 0,7	<0,001
Erytrocyturia <i>Erythrocyturia</i>	liczba/ wpw number/ hpf	8,5 ± 1,4	9,3 ± 2,1	NS

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE z n badań.

Values reported as mean ± SE.

wpw – w polu widzenia

hpf – high power field

Różnice te uwydatniają się jeszcze wyraźniej po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem [tabela 15]. Ponadto, porównując podstawowe parametry gospodarki lipidowej, jak: stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w surowicy zaobserwowano różnice znamienne statystycznie pomiędzy chorymi RE i N-RE. Wyższe wartości stwierdzano chorych N-RE. Erytrocyturia po sześciu miesiącach terapii cyklofosfamidem jest około dwukrotnie wyższa u pacjentów N-RE. Pozostałe badania, jak parametry funkcji nerek czy stężenie hemoglobiny i limfocytoza we krwi nie różnią się pomiędzy chorymi RE a N-RE.

W grupie pacjentów N-RE obserwuje się jednak powolny spadek dobowego wydalania białka z moczem w czasie sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem. W przypadku porównania wielkości proteinurii sprzed leczenia i po sześciu miesiącach uzyskano statystycznie znamienne ($p < 0,05$) spadek z $6,4 \pm 3,2$ g na $4,2 \pm 0,5$ g na dobę.

Tabela 15. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem

Table 15. Laboratory values of the study patients after six months of cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> (RE) n=47	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) n=20	P RE vs N-RE
Kreatynina w surowicy <i>Serum</i> <i>Creatinine</i>	mg/dl	1,08 ± 0,04	1,48 ± 0,24	NS
Klirens kreatyniny <i>Creatinine</i> <i>Clearance</i>	ml/min	86,7 ± 4,7	74,3 ± 8,1	NS
Hemoglobina we krwi <i>Blood</i> <i>Hemoglobin</i>	g/dl	12,5 ± 0,3	13,4 ± 0,4	NS
Limfocytoza we krwi <i>Blood</i> <i>Lymphocytes</i> <i>Count</i>	liczba/mm ³ <i>number/</i> <i>mm³</i>	1620 ± 130	1870 ± 260	NS
Białko całkowite w surowicy <i>Serum Total</i> <i>Protein</i>	g/dl	6,9 ± 0,1	6,0 ± 0,2	<0,001
Albumina w surowicy <i>Serum</i> <i>Albumin</i>	g/dl	4,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	<0,001
Cholesterol w surowicy <i>Serum</i> <i>Cholesterol</i>	mg/dl	240 ± 10	308 ± 26	<0,02

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> (RE) n=47	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) n=20	P RE vs N-RE
Trójglicerydy w surowicy <i>Serum</i> <i>Triglycerides</i>	mg/dl	180 ± 12	223 ± 22	<0,04
Białko w moczu <i>Urine Protein</i>	g/24 h	0,9 ± 0,1	4,2 ± 0,5	<0,001
Erytrocyturia <i>Erythrocyturia</i>	liczba/wpw <i>number/hpf</i>	4,6 ± 1,0	8,3 ± 1,7	<0,02

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE z n badań.

Values reported as mean ± SE.

wpw – w polu widzenia

hpf – *high power field*

Spośród badań immunologicznych [tabela 16] wyraźne różnice zaobserwowano jedynie w przypadku stężenia IgG w surowicy, które to było około 1,5-krotnie wyższe u pacjentów RE. Nie obserwowano różnic w mianie przeciwciał ANA, stężeniu składowych dopełniacza: C3 i C4 oraz stężeniu IgA i IgM w surowicy pomiędzy badanymi grupami chorych po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem.

Tabela 16. Wyniki badań immunologicznych badanych pacjentów po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem

Table 16. Serology tests of the study patients after six months of cyclophosphamide treatment

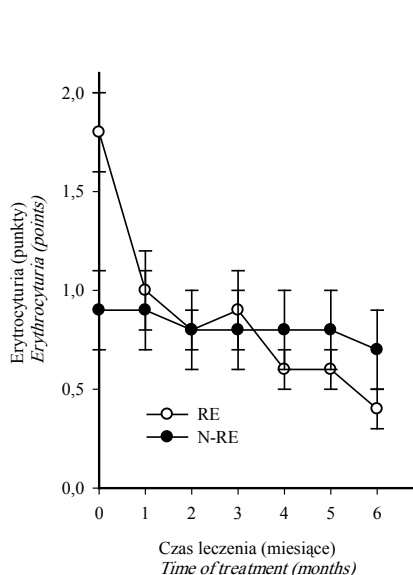
Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders (RE)</i> n=47	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders (N-RE)</i> n=20	P RE vs N-RE
IgG w surowicy <i>Serum IgG</i>	g/l	10,5 ± 0,4	7,4 ± 0,7	<0,001
IgM w surowicy <i>Serum IgM</i>	g/l	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,9	NS
IgA w surowicy <i>Serum IgA</i>	g/l	2,5 ± 0,3	2,3 ± 0,1	NS
C3 w surowicy <i>Serum C3</i>	g/l	0,87 ± 0,04	0,88 ± 0,07	NS
C4 w surowicy <i>Serum C4</i>	g/l	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02	NS
ANA w surowicy <i>Serum ANA</i>	miano <i>titer</i>	660 ± 120	700 ± 190	NS

Wyniki podano jako średnia ± SE z n badań.

Values reported as mean ± SE.

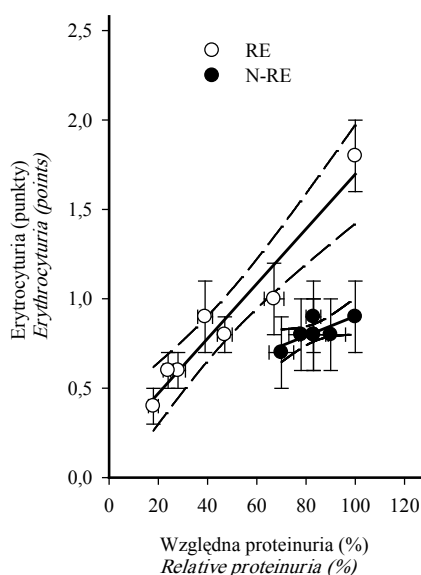
4.2.2. Ocena zmian najważniejszych wskaźników choroby w trakcie sześciomiesięcznego leczenia cyklofosfamidem

W czasie sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem obserwowano wyraźny spadek wskaźnika Ecyt [rycina 6] w grupie chorych RE, podczas gdy u chorych N-RE wskaźnik Ecyt utrzymywał się na niezmiennym poziomie. Najwyraźniejszy spadek wskaźnika Ecyt u chorych RE występował w okresie pierwszych dwóch miesięcy leczenia, a po czwartym miesiącu wskaźnik ten był niższy w grupie pacjentów RE.



Rycina 6. Wielkość wskaźnika erytrocyturii (Ecyt) u badanych pacjentów w czasie sześciomiesięcznego leczenia cyklofosfamidem. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SE

Figure 6. The erythrocyturia marker (Ecyt) in the study patients during the six months period of cyclophosphamide treatment. Values reported as mean \pm SE

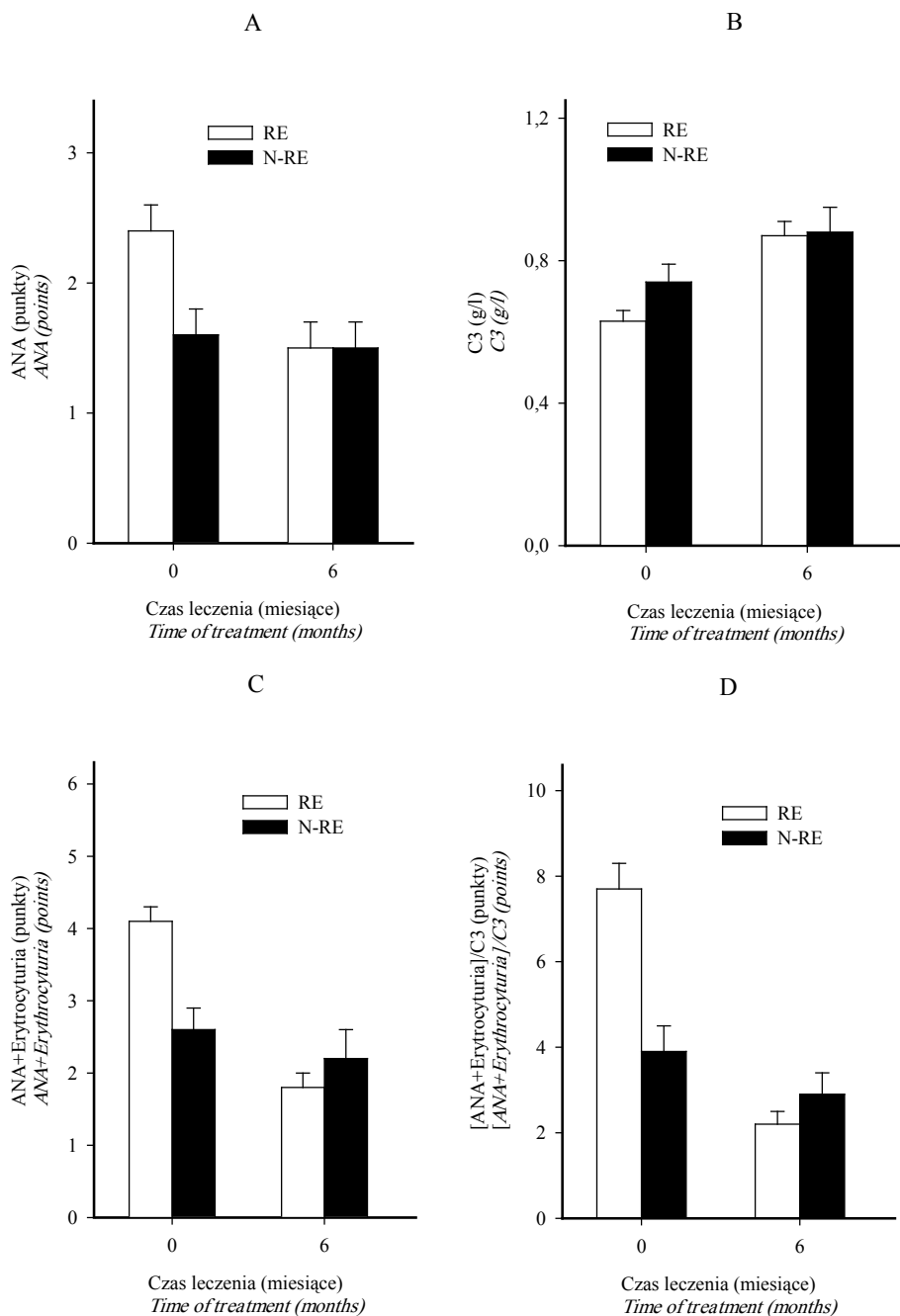


Rycina 7. Współzależność pomiędzy wielkością względnej proteinurii a wskaźnikiem erytrocyturii (Ecyt) u badanych pacjentów w czasie sześciomiesięcznego leczenia cyklofosfamidem. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SE

Figure 7. Interdependence between relative proteinuria and the erythrocyturia marker (Ecyt) in the study patients during the six months period of cyclophosphamide treatment. Values reported as mean \pm SE

Przebieg krzywych wskaźnika Ecyt w czasie sześciu miesięcy terapii cyklofosfamidem jest wyraźnie podobny do przebiegu krzywych względnych zmian wydalania białka z moczem w badanych grupach chorych RE i N-RE [rycina 2]. W celu sprawdzenia czy istnieje związek statystyczny pomiędzy wskaźnikiem Ecyt a względnym wydalaniem białka z moczem w czasie sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem zbadano korelację pomiędzy tymi parametrami [rycina 7]. Uzyskane wyniki wskazują na wysoce znamiennej statystycznie korelację pomiędzy tymi parametrami w grupie chorych RE ($r=0,97$; $p=0,0004$) W przypadku chorych N-RE zależność ta jest słabiej zaznaczona ($r=0,75$; $p<0,05$).

Po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem obserwowano również wyraźne zmiany w pozostałych parametrach, które przyjęto za wskaźniki przebiegu choroby. Dynamikę zmian tych wskaźników przedstawia rycina 8.



Rycina 8. Wskaźniki: ANA, C3, ANA+Ecyt oraz [ANA+Ecyt]/C3 u badanych pacjentów przed i po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem.

Figure 8. The markers: ANA, C3, ANA+Ecyt and [ANA+Ecyt]/C3 in the study patients before and after six months of cyclophosphamide treatment.

W grupie chorych reagujących (RE) na leczenie najważniejsze wskaźniki przebiegu nefropatii toczniowej obniżyły się do poziomów obserwowanych u pacjentów N-RE [tabela 17]. Wskaźnik ANA obniżył się o około 40%, a wskaźnik Ecyt około 80%, podobnie sumaryczny wskaźnik ANA+Ecyt o około 55%, a wskaźnik [ANA+Ecyt]/C3 był niższy aż o około 70%. We wszystkich przypadkach u pacjentów RE wskaźniki te po sześciu miesiącach leczenia różniły się znamienne statystycznie od wyników uzyskanych na początku leczenia.

W grupie pacjentów N-RE nie obserwowano zmian we wskaźnikach przebiegu choroby przed i po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem.

Jedynym wskaźnikiem, który uległ wzrostowi po sześciu miesiącach leczenia do podobnych poziomów w obydwu badanych grupach było stężenie składowej C3 dopełniacza w surowicy.

Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że zarówno erytrocyturia, jak i ANA są najlepszymi, obok proteinurii wskaźnikami efektywności leczenia cyklofosfamidem.

Tabela 17. Wskaźniki przebiegu choroby u badanych pacjentów po sześciu miesiącach leczenia

Table 17. The markers during the timecourse of the disease in the study patients after six months of treatment

Wskaźnik <i>Marker</i>	Reagujący (RE) <i>Responders (RE)</i> <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders (N-RE)</i> <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
ANA (punkty) <i>ANA (points)</i>	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	NS
Ecyt (punkty) <i>Ecyt (points)</i>	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	NS
C3 w surowicy (g/l) <i>Serum C3 (g/l)</i>	0,87 ± 0,04	0,88 ± 0,07	NS
ANA+Ecyt (punkty) <i>ANA+Ecyt (points)</i>	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,4	NS
[ANA+Ecyt]/C3 (punkty) <i>[ANA+Ecyt]/C3 (points)</i>	2,2 ± 0,3	2,9 ± 0,5	NS

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE.

Values reported as mean ± SE.

4.3. Ocena efektu leczenia immunosupresyjnego pacjentów w okresie od sześciu do dwunastu miesięcy

Po zakończeniu sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem badani pacjenci otrzymywali leczenie podtrzymujące, które polegało na kontynuacji dożylnych pulsów cyklofosfamidu albo otrzymywali leki doustne, jak: azatiopryna, mykofenolan mofetilu lub cyklosporyna. W grupie chorych reagujących (RE) leczenie cyklofosfamidem kontynuowano u 14 chorych (RE-CYC). W przypadku 7 pacjentów nie kontynuowano leczenia immunosupresyjnego (RE-Nie leczenia), a pozostałych 26 chorych otrzymywało inne leczenie (RE-Inne) w postaci: azatioprynę (17 chorych), cyklosporynę (7 chorych) i mykofenolan mofetilu (2 chorych). W przypadku chorych niereagujących (N-RE) leczenie cyklofosfamidem otrzymywało nadal 11 chorych (N-RE-CYC), a pozostałych 9 chorych inne leki immunosupresyjne (N-RE-Inne), jak: mykofenolan mofetilu – 7 chorych oraz cyklosporynę - 2 chorych. Dwoje chorych z grupy pacjentów N-RE otrzymywało cyklosporynę, ponieważ nie tolerowali oni leczenia mykofenolanem mofetilu.

Kolejnym etapem prowadzonych badań była ocena efektywności leczenia podtrzymującego cyklofosfamidem lub innymi lekami i ich wpływu na wskaźniki przebiegu choroby. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy konieczne jest leczenie podtrzymujące oraz czy, któryś z rodzajów terapii podtrzymującej można uznać za efektywniejszy.

4.3.1. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów w okresie od szóstego do dwunastego miesiąca leczenia immunosupresyjnego

Wyniki podstawowych badań laboratoryjnych, wykonywanych po 9 [tabela 18] oraz po 12 [tabela 19] miesiącach leczenia cyklofosfamidem lub innymi lekami nie różniły się istotnie od wyników, uzyskanych po sześciu miesiącach leczenia. Obserwowano nadal znaczącą różnicę w wielkości dobowego wydalania białka z moczem pomiędzy pacjentami reagującymi (RE) i niereagującymi (N-RE). Towarzyszyły temu wyraźnie niższe stężenia białka całkowitego i albuminy w surowicy u chorych N-RE. Dodatkowo u pacjentów niereagujących (N-RE) obserwowano wyższą erytrocyturię, około 3 – krotnie w porównaniu z pacjentami RE. Pozostałe badania, jak parametry funkcji nerek czy stężenie hemoglobiny i limfocytoza we krwi nie różniły się pomiędzy badanymi grupami chorych RE i N-RE.

Tabela 18. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów po 9 miesiącach leczenia cyklofosfamidem

Table 18. Laboratory values of the study patients after 9 months of cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders (RE)</i> <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders (N-RE)</i> <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
Kreatynina w surowicy <i>Serum Creatinine</i>	mg/dl	1,06 ± 0,04	1,53 ± 0,23	=0,02
Klirens kreatyniny <i>Creatinine Clearance</i>	ml/min	82,4 ± 5,1	72,3 ± 7,1	NS
Hemoglobina we krwi <i>Blood Hemoglobin</i>	g/dl	12,8 ± 0,2	13,2 ± 0,4	NS
Limfocytoza we krwi <i>Blood Lymphocytes Count</i>	liczba/ mm ³ <i>number/ mm³</i>	1740 ± 120	1770 ± 250	NS
Białko całkowite w surowicy <i>Serum Total Protein</i>	g/dl	6,8 ± 0,1	6,1 ± 0,1	<0,001
Albumina w surowicy <i>Serum Albumin</i>	g/dl	4,2 ± 0,1	3,6 ± 0,1	<0,001
Białko w moczu <i>Urine Protein</i>	g/24 h	0,8 ± 0,1	4,1 ± 0,6	<0,001
Erytrocyturia <i>Erythrocyturia</i>	liczba/ wpw <i>number/ hpf</i>	3,6 ± 0,8	8,8 ± 1,9	=0,03

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE.

Values reported as mean ± SE.

wpw – w polu widzenia

hpf – high power field

Tabela 19. Wyniki badań laboratoryjnych badanych pacjentów po 12 miesiącach leczenia cyklofosfamidem

Table 19. Laboratory values of the study patients after 12 months of cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> (RE) <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
Kreatynina w surowicy <i>Serum</i> <i>Creatinine</i>	mg/dl	1,06 ± 0,05	1,49 ± 0,22	NS
Klirens kreatyniny <i>Creatinine</i> <i>Clearance</i>	ml/min	82,6 ± 4,7	72,6 ± 7,4	NS
Hemoglobina we krwi <i>Blood</i> <i>Hemoglobin</i>	g/dl	12,9 ± 0,2	13,2 ± 0,4	NS
Limfocytoza we krwi <i>Blood</i> <i>Lymphocytes</i> <i>Count</i>	liczba/mm ³ <i>number/</i> <i>mm³</i>	1760 ± 130	1810 ± 260	NS
Białko całkowite w surowicy <i>Serum Total</i> <i>Protein</i>	g/dl	6,9 ± 0,1	6,2 ± 0,2	<0,001
Albumina w surowicy <i>Serum Albumin</i>	g/dl	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1	=0,002
Cholesterol w surowicy <i>Serum</i> <i>Cholesterol</i>	mg/dl	223 ± 7	270 ± 25	=0,02
Trójglicerydy w surowicy <i>Serum</i> <i>Triglycerides</i>	mg/dl	164 ± 14	189 ± 22	NS

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> (RE) <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
Białko w moczu <i>Urinary Protein</i>	g/24 h	0,6 ± 0,1	3,8 ± 0,6	<0,001
Erytrocyturia <i>Erythrocyturia</i>	liczba/wpw <i>number/hpf</i>	3,2 ± 0,9	6,1 ± 0,2	=0,03

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE.

Values reported as mean ± SE.

wpw – w polu widzenia

hpf – high power field

Spośród badań immunologicznych [tabela 20] wyraźne różnice zaobserwowano jedynie w przypadku stężenia IgG w surowicy, które to było około 1,5-krotnie wyższe u pacjentów RE, podobnie do wyników uzyskanych po sześciu miesiącach leczenia. Wyniki pozostałych badań immunologicznych, jak: miano przeciwciał ANA, stężenie składowej C3 dopełniacza oraz stężenia IgA i IgM w surowicy nie różniły się pomiędzy badanymi grupami chorych po 12 miesiącach leczenia immunosupresyjnego.

Tabela 20. Wyniki badań immunologicznych badanych pacjentów po 12 miesiącach leczenia cyklofosfamidem

Table 20. Serology tests of the study patients after 12 months of cyclophosphamide treatment

Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> (RE) <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
IgG w surowicy <i>Serum IgG</i>	g/l	10,6 ± 0,4	6,9 ± 0,7	<0,001
IgM w surowicy <i>Serum IgM</i>	g/l	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	NS

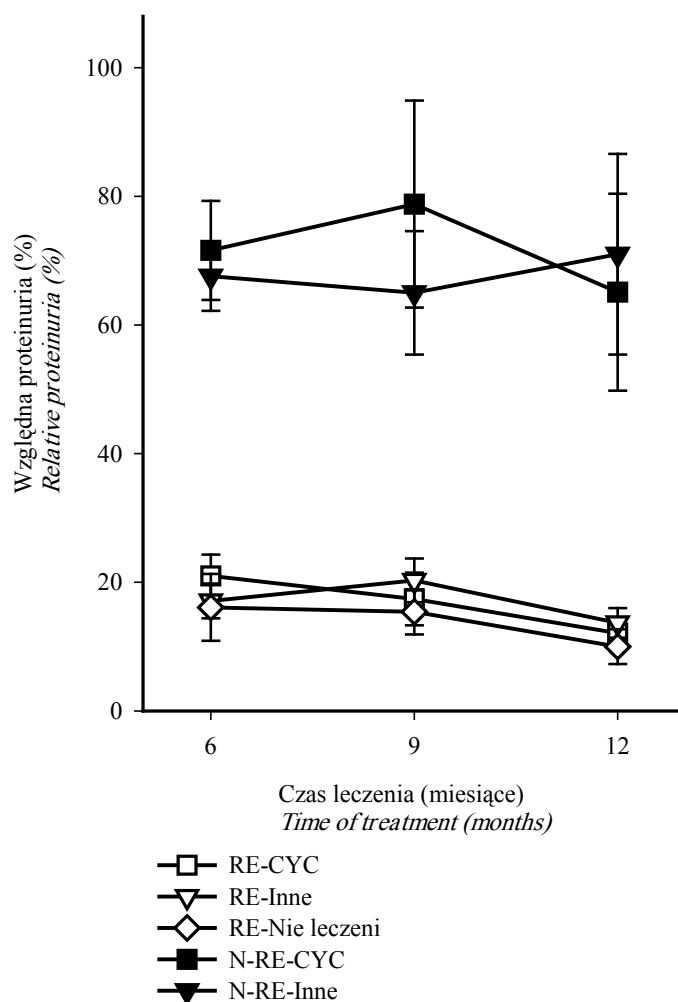
Parametr <i>Parameter</i>	Jednostka <i>Unit</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> (RE) n=47	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) n=20	P RE vs N-RE
IgA w surowicy <i>Serum IgA</i>	g/l	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,2	NS
C3 w surowicy <i>Serum C3</i>	g/l	0,90 ± 0,03	0,94 ± 0,07	NS
C4 w surowicy <i>Serum C4</i>	g/l	0,16 ± 0,02	0,21 ± 0,02	<0,01
ANA w surowicy <i>Serum ANA</i>	miano <i>titer</i>	690 ± 120	490 ± 170	NS

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE.

Values reported as mean ± SE.

4.3.2. Ocena zmian najważniejszych wskaźników przebiegu choroby między szóstym a dwunastym miesiącem leczenia immunosupresyjnego

W okresie od szóstego do 12 miesiąca leczenia obserwowano dalszy spadek wielkości dobowego wydalania białka z moczem u chorych RE [rycina 9]. Wielkość względnej proteinurii (mierzonej w stosunku do wielkości proteinurii sprzed leczenia) pomiędzy szóstym a 12 miesiącem leczenia obniżyła się statystycznie znamienne u chorych RE z 18,1±1,9% do 12,7±1,5% (p<0,01). W grupie chorych RE różnicę statystycznie zmienną zaobserwowano u chorych leczonych CYC (p<0,02), chociaż procentowy spadek proteinurii obecny był również u chorych leczonych innymi lekami oraz nieleczonych. W grupie chorych N-RE nie obserwowano statystycznie zmiennego spadku białkomoczu dobowego w czasie kolejnych sześciu miesięcy leczenia niezależnie od rodzaju podawanych leków immunosupresyjnych.



Rycina 9. Wielkość względnego wydalania białka z moczem u badanych pacjentów w czasie od 6 do 12 miesiąca leczenia

Figure 9. Relative proteinuria in the study patients between 6th and 12th month of treatment

W tym samym czasie [tabela 21] obserwowano spadek wskaźnika Ecyt w grupie pacjentów RE, podczas gdy u chorych N-RE wskaźnik Ecyt utrzymywał się na niezmiennym poziomie. Po 12 miesiącach leczenia wskaźnik Ecyt był statystycznie znacząco wyższy ($p < 0,05$) u chorych N-RE w porównaniu z chorymi RE. Ponadto po 12 miesiącach leczenia immunosupresyjnego nie obserwowano wyraźnych różnic pomiędzy grupami chorych N-RE i RE we wskaźnikach, które przyjęto jako wskaźniki przebiegu choroby, z wyjątkiem wskaźnika Ecyt.

Wartości wskaźników: ANA, C3, ANA+Ecyt oraz [ANA+Ecyt]/C3 były podobne w obydwu grupach chorych RE i N-RE.

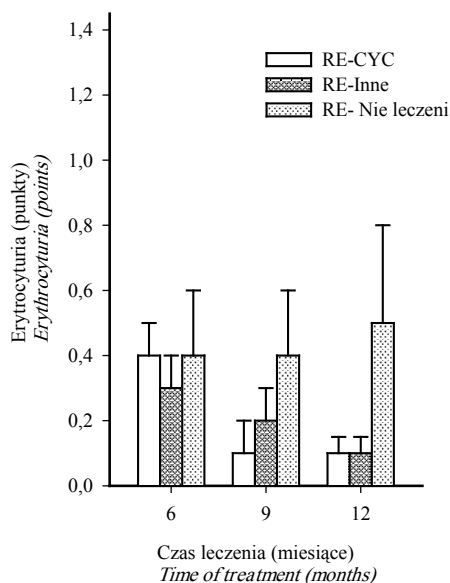
Tabela 21. Wskaźniki przebiegu choroby u badanych pacjentów po 12 miesiącach leczenia
Table 21. The markers during the timecourse of the disease in the study patients after 12 months of treatment

Wskaźnik <i>Marker</i>	Reagujący (RE) <i>Responders</i> (RE) <i>n=47</i>	Niereagujący (N-RE) <i>Non responders</i> (N-RE) <i>n=20</i>	P RE vs N-RE
ANA (punkty) <i>ANA (points)</i>	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2	NS
Ecyt (punkty) <i>Ecyt (points)</i>	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	<0,05
C3 w surowicy (g/l) <i>Serum C3 (g/l)</i>	0,90 ± 0,03	0,94 ± 0,07	NS
ANA+Ecyt (punkty) <i>ANA+Ecyt (points)</i>	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,3	NS
[ANA+Ecyt]/C3 (punkty) <i>[ANA+Ecyt]/C3 (points)</i>	1,9 ± 0,4	1,8 ± 0,4	NS

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SE. *Values reported as mean ± SE.*

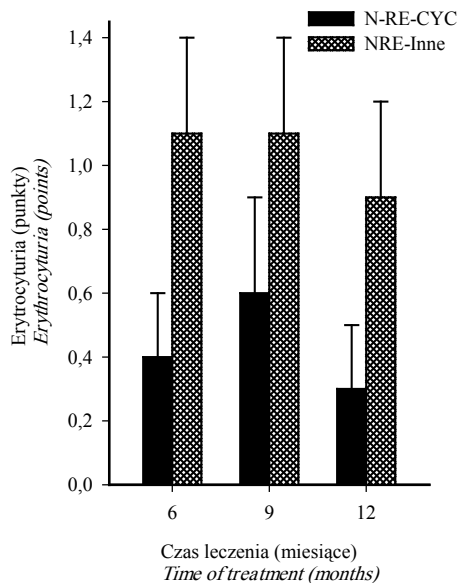
Wskaźnik Ecyt w grupie chorych RE [rycina 10] obniżył się statystycznie znamienne zarówno u chorych leczonych cyklofosfamidem ($p=0,02$), jak i u chorych, otrzymujących inne leki ($p=0,02$). Jedynie u 7 chorych nieleczonych nie obserwowano spadku wskaźnika Ecyt. Odmienne obserwowano u chorych N-RE [rycina 11], gdzie niezależnie od prowadzonego leczenia podtrzymującego wskaźnik Ecyt utrzymywał się na niezmiennym poziomie.

W grupie chorych RE pomiędzy szóstym a 12 miesiącem leczenia, niezależnie od prowadzonego leczenia immunosupresyjnego, nie były obecne różnice statystycznie znamienne pomiędzy wskaźnikami procesu leczenia [rycina 12].



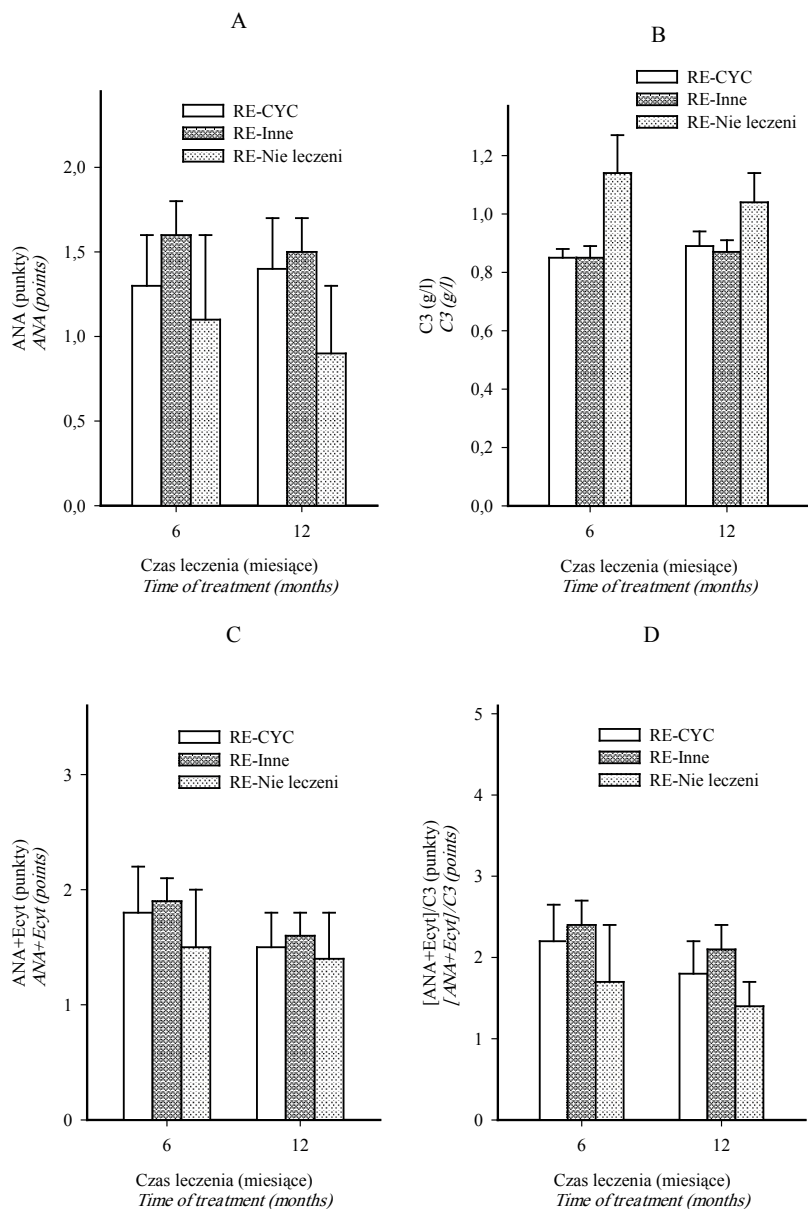
Rycina 10. Dynamika zmian wskaźnika Ecyt u pacjentów RE w okresie od 6 do 12 miesiąca w zależności od rodzaju leczenia podtrzymującego.

Figure 10. Changes in the Ecyt marker dynamics in the responders between 6th and 12th month, depending on the applied type of maintenance treatment.



Rycina 11. Dynamika zmian wskaźnika Ecyt u pacjentów N-RE w okresie od 6 do 12 miesiąca w zależności od rodzaju leczenia podtrzymującego.

Figure 11. Changes in the Ecyt marker dynamics in the non responders between 6th and 12th month, depending on the applied type of maintenance treatment.



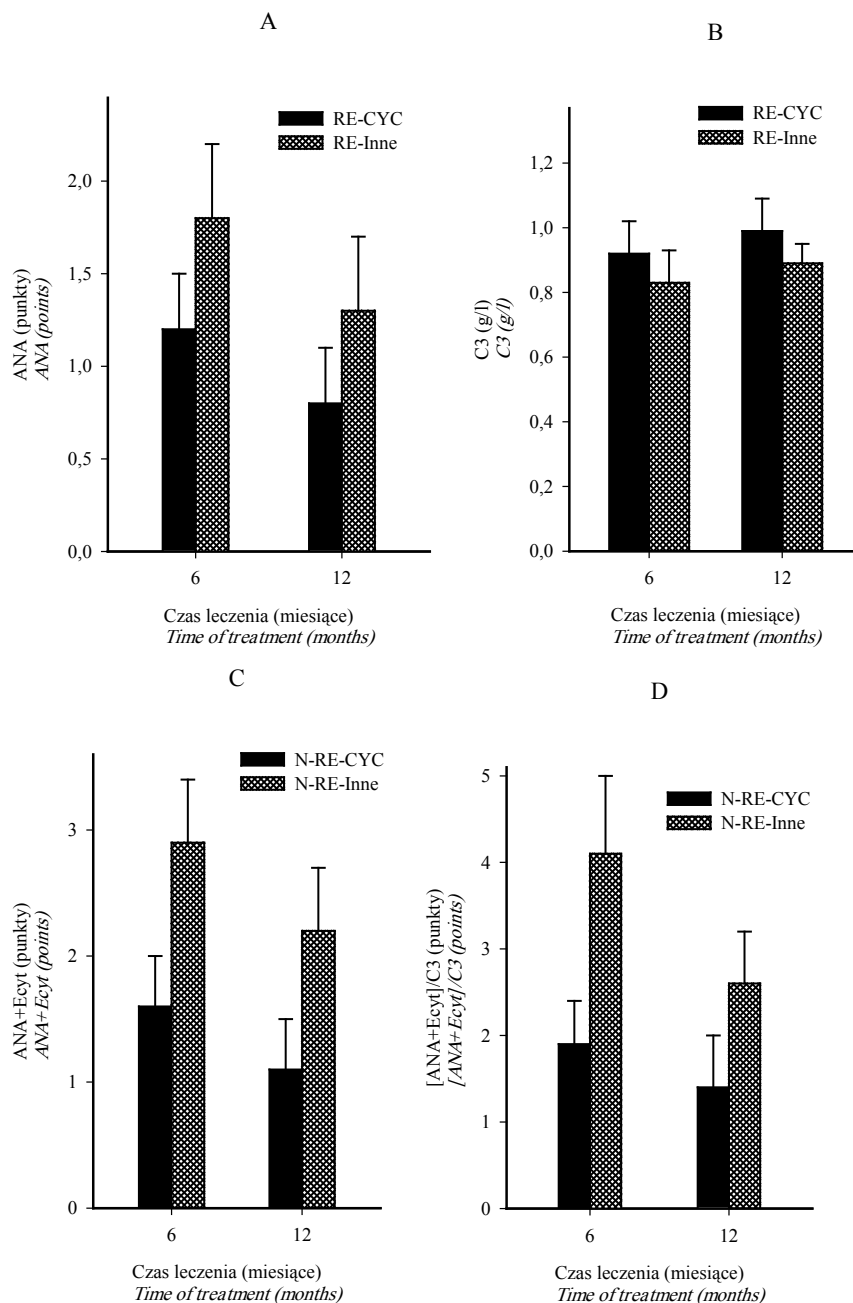
Rycina 12. Najważniejsze wskaźniki przebiegu choroby u pacjentów reagujących (RE) pomiędzy 6 a 12 miesiącem leczenia w zależności od rodzaju leczenia podtrzymującego

Figure 12. The most important markers in the timecourse of the disease in the responders (RE) between 6th and 12th month, depending on the applied type of maintenance treatment

Odmienne obserwacje poczyniono u chorych N-RE [rycina 13]. Podczas gdy wskaźnik Ecyt i stężenie składowej C3 dopełniacza nie zmieniły się pomiędzy szóstym a 12 miesiącem leczenia, to pozostałe wskaźniki jednak uległy zmianom. W przypadku pacjentów N-RE leczonych cyklofosfamiem (N-RE-CYC) uzyskano statystycznie znamienne ($p=0,03$) spadek wskaźnika ANA, statystycznie znamienne ($p=0,03$) spadek wskaźnika ANA+Ecyt, a spadek wskaźnika [ANA+Ecyt]/C3 był na granicy znamienności statystycznej ($p=0,053$). U pacjentów N-RE leczonych innymi lekami (N-RE-Inne) jedynie wskaźnik [ANA+Ecyt]/C3 zmienił się znamienne statystycznie ($p=0,02$), a w przypadku wskaźnika ANA ($p=0,1$) i wskaźnika ANA+Ecyt ($p=0,1$) różnice były na granicy znamienności statystycznej.

Przedstawione wyniki potwierdzają tezę o słuszności leczenia podtrzymującego u chorych z nefropatią toczniową. Leczenie podtrzymujące pulsami cyklofosfamidami okazało się tak samo efektywne, jak leczenie innymi lekami w grupie chorych RE. Potwierdza to fakt, że w okresie kolejnych sześciu miesięcy leczenia uzyskuje się dalszy spadek proteinurii i erytrocyturii. W grupie chorych N-RE, niezależnie od prowadzonego leczenia immunosupresyjnego, różnic nie obserwuje się.

Na uwagę zasługuje fakt, że pomimo obecnych różnic w wielkości erytrocyturii w grupach chorych RE i N-RE, wskaźniki ANA+Ecyt oraz [ANA+Ecyt]/C3 po dwunastu miesiącach leczenia pozostają podobne w obydwu grupach chorych.



Rycina 13. Najważniejsze wskaźniki przebiegu choroby u pacjentów niereagujących (N-RE) pomiędzy 6 a 12 miesiącem leczenia w zależności od rodzaju leczenia podtrzymującego

Figure 13. The most important markers in the timecourse of the disease in the non responders (N-RE) between 6th and 12th month, depending on the applied type of maintenance treatment

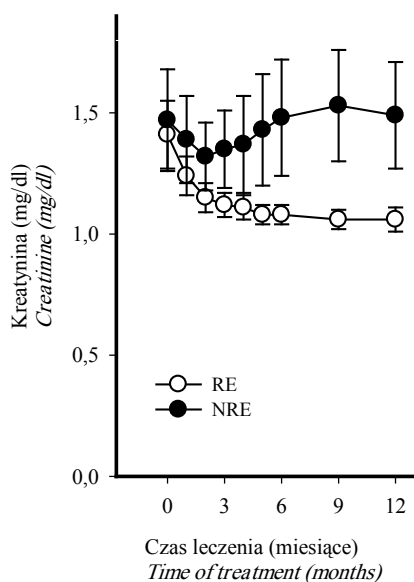
4.4. Ocena funkcji nerek w okresie dwunastu miesięcy leczenia immunosupresyjnego

Kolejnym etapem przeprowadzonych badań było sprawdzenie czy leczenie immunosupresyjne wywiera wpływ na poprawę funkcji nerek u pacjentów RE i N-RE. Oceniano zachowanie się parametrów, jak: stężenie kreatyniny i klirens kreatyniny endogennej u badanych chorych.

W czasie 12 miesięcy leczenia immunosupresyjnego stężenie kreatyniny [rycina 14] w surowicy stopniowo malało u chorych RE z $1,41 \pm 0,12$ mg/dl do $1,06 \pm 0,05$ mg/dl, podczas gdy u chorych N-RE po przejściowym spadku w pierwszych miesiącach leczenia, praktycznie nie uległo zmianie. Przejawem tych różnic są współzależności uwidocznione na rycinie 15. W grupie pacjentów RE zaobserwowano wysoce znamiennej związek pomiędzy stężeniem kreatyniny w surowicy a względnym wydalaniem białka z moczem w okresie 12 miesięcy leczenia ($r=0,986$; $p<0,00001$). Takiej współzależności nie obserwuje się w grupie pacjentów N-RE.

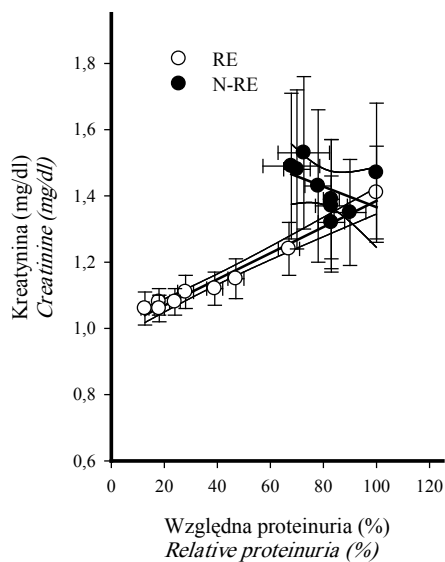
W okresie sześciu miesięcy leczenia podtrzymującego nie obserwowano zmian w stężeniu kreatyniny [rycina 16] w surowicy w poszczególnych grupach chorych, niezależnie od podawanych leków immunosupresyjnych.

Na poprawę funkcji nerek w grupie pacjentów RE wskazuje dodatkowo wzrost wielkości klirensu kreatyniny endogennej [rycina 17]. Klirens kreatyniny wzrósł o około 19% i około 25% odpowiednio po trzecim i po szóstym miesiącu leczenia. Następnie przez okres kolejnych sześciu miesięcy terapii utrzymywał się na niezmiennym poziomie. Podobnych zmian nie obserwuje się u pacjentów N-RE.



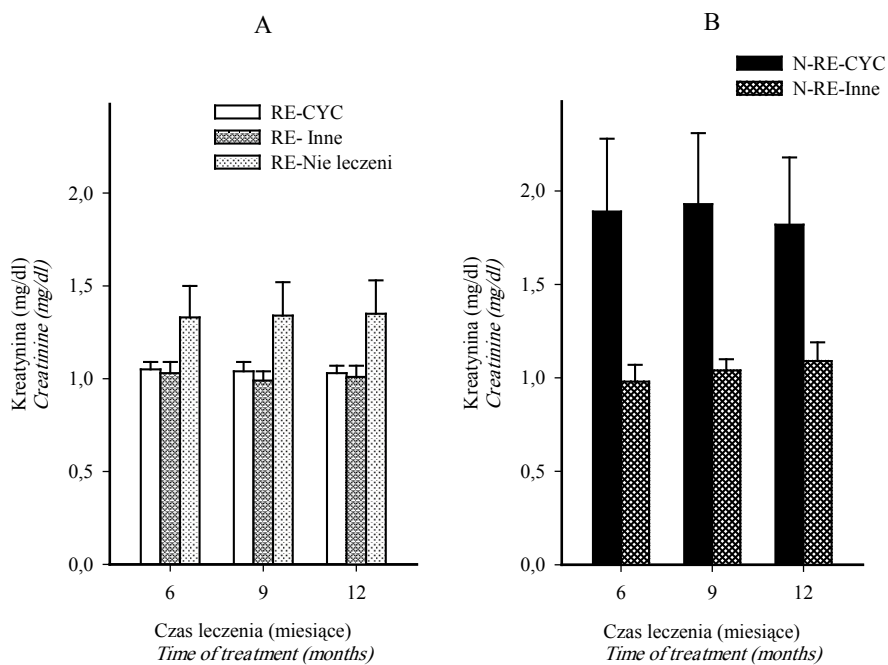
Rycina 14. Stężenie kreatyniny w surowicy u badanych pacjentów w okresie 12 miesięcy leczenia

Figure 14. Serum level of creatinine in the study patients during the 12 months period of treatment

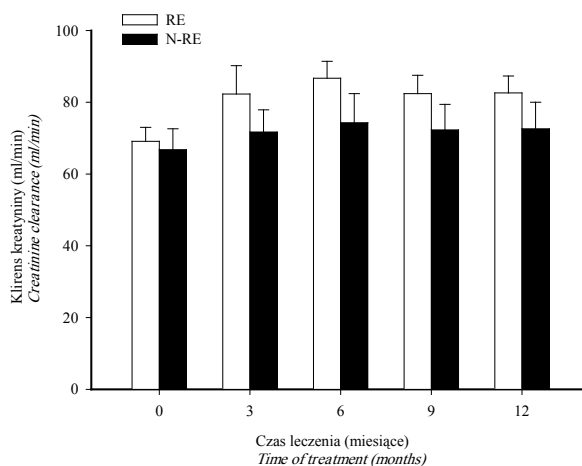


Rycina 15. Współzależność pomiędzy wielkością względnego wydalania białka z moczem a stężeniem kreatyniny w surowicy u badanych pacjentów w okresie 12 miesięcy leczenia

Figure 15. Interdependence between relative proteinuria and serum level of creatinine in the study patients during the 12 months period of treatment



Rycina 16. Stężenie kreatyniny w surowicy u badanych pacjentów w okresie od 6 do 12 miesiąca w zależności od rodzaju leczenia podtrzymującego
 Figure 16. Serum level of creatinine in the study patients between 6th and 12th month, depending on the applied type of maintenance treatment

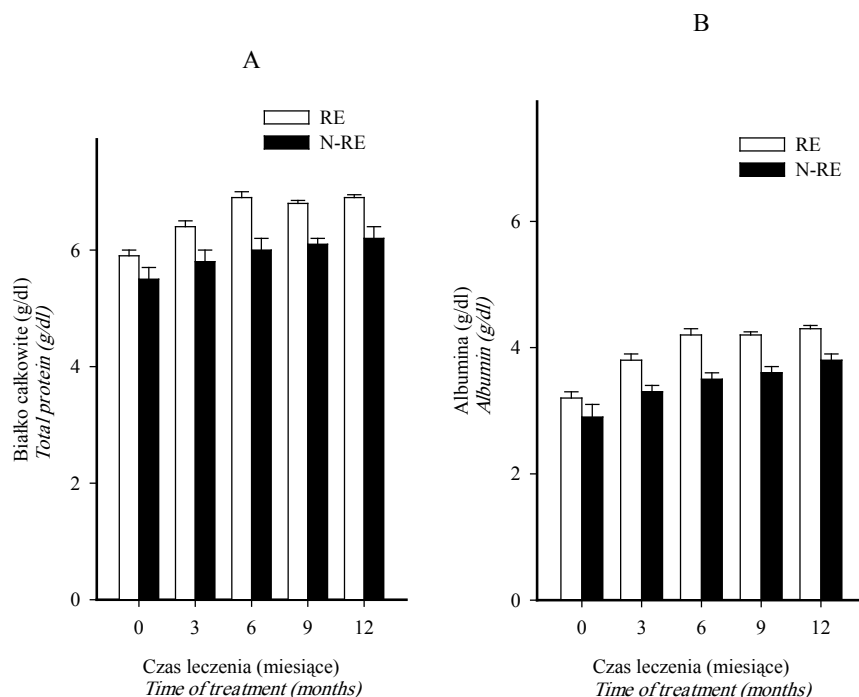


Rycina 17. Klirens kreatyniny endogennej u badanych pacjentów w okresie 12 miesięcy leczenia
 Figure 17. Endogenous creatinine clearance in the study patients during the 12 months period of treatment

4.5. Ocena stanu gospodarki białkowej i lipidowej w czasie dwunastu miesięcy leczenia immunosupresyjnego

Ostatnim etapem badań było sprawdzenie, czy w czasie trwania leczenia immunosupresyjnego dochodzi do zmian w podstawowych parametrach gospodarki białkowej i lipidowej.

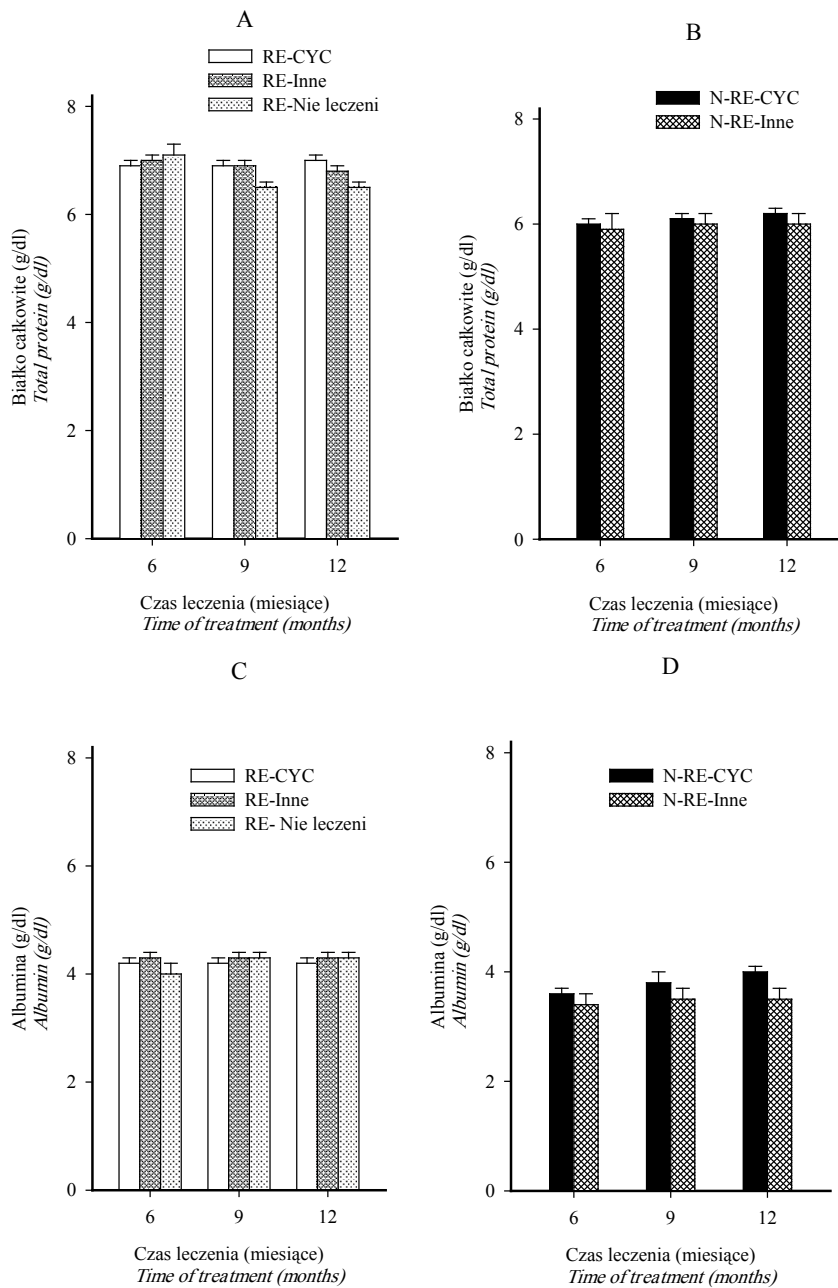
W okresie sześciomiesięcznej terapii cyklofosfamidem w grupie pacjentów RE wzrastało stężenie białka całkowitego o około 15% i albuminy w surowicy o około 30% [rycina 18], a w czasie leczenia podtrzymującego parametry gospodarki białkowej utrzymywały się na stałym poziomie. U pacjentów N-RE stężenie białka całkowitego w surowicy nie zmieniło się w trakcie leczenia immunosupresyjnego. Jednak stężenie albuminy w surowicy wykazywało powolną tendencję wzrostową w okresie roku terapii i w tym przypadku uzyskano różnice znamienne statystycznie.



Rycina 18. Stężenie białka całkowitego i albuminy w surowicy u badanych pacjentów w okresie dwunastu miesięcy leczenia

Figure 18. Serum level of total protein and albumin in the study patients during the twelve months period of treatment

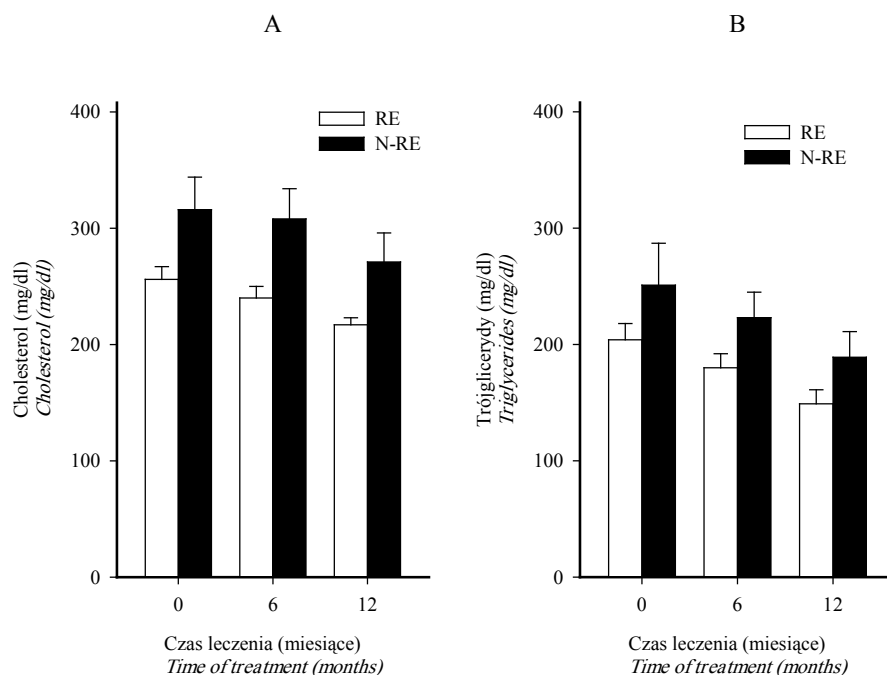
Parametry gospodarki białkowej nie wykazywały istotnych różnic w badanych grupach chorych w zależności od prowadzonego leczenia podtrzymującego [rycina 19].



Rycina 19. Stężenie białka całkowitego i albuminy w surowicy u badanych pacjentów w okresie od 6 do 12 miesiąca w zależności od rodzaju leczenia podtrzymującego

Figure 19. Serum level of total protein and albumin in the study patients between 6th and 12th month, depending on the applied type of maintenance treatment

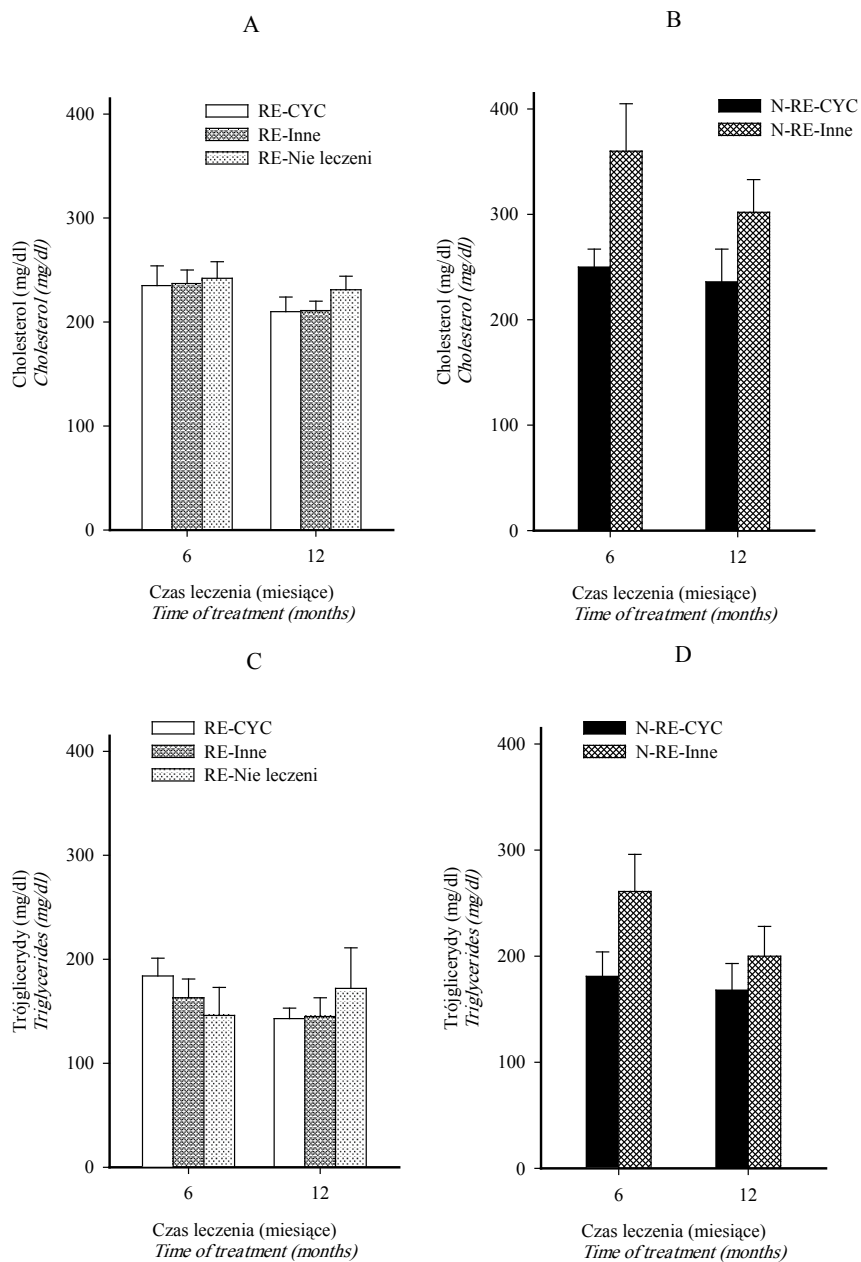
Parametry gospodarki lipidowej [rycina 20] nie zmieniły się w sposób tak wyraźny, jak parametry gospodarki białkowej. U pacjentów RE obserwuje się statystycznie znamienne ($p < 0,05$) niższe stężenie cholesterolu dopiero po 12 miesiącach leczenia, a stężenie trójglicerydów zmniejszyło się statystycznie znamienne ($p < 0,001$) już po sześciu miesiącach. W przypadku chorych N-RE parametry gospodarki lipidowej nie uległy zasadniczym zmianom.



Rycina 20. Stężenie cholesterolu i trójglicerydów w surowicy u badanych pacjentów w okresie 12 miesięcy leczenia

Figure 20. Serum level of cholesterol and triglycerides in the study patients during the 12 months period of treatment

Stężenie cholesterolu i trójglicerydów w surowicy nie wykazywało wyraźnych różnic pomiędzy badanymi grupami w zależności od zmian w prowadzonej terapii podtrzymującej [rycina 21].



Rycina 21. Stężenie cholesterolu i trójglicerydów w surowicy u badanych pacjentów od 6 do 12 miesiąca w zależności od rodzaju leczenia podtrzymującego
 Figure 21. Serum level of cholesterol and triglycerides in the study patients between 6th and 12th month, depending on the applied type of maintenance treatment

5. DYSKUSJA

Zasady leczenia nefropatii w przebiegu toczenia rumieniowatego układowego cyklofosfamidem opierają się na badaniach Narodowego Instytutu Zdrowia (*National Institute of Health, NIH*) w Stanach Zjednoczonych, przeprowadzonych w latach 70 i 80 ubiegłego wieku. Do lat 90 cyklofosfamid łącznie ze steroidami był praktycznie jedynym leczeniem aktywnej nefropatii toczniowej [5, 12, 30, 52, 77, 87, 88, 93, 123]. Zdecydowanie rzadziej stosowano azatioprynę, głównie jako rodzaj terapii podtrzymującej [16, 79, 81]. Kolejnym lekiem, który z powodzeniem był stosowany u chorych z nefropatią toczniową była cyklosporyna [11, 126, 162]. Jednak ze względu na szereg działań ubocznych, głównie jej nefrotoksyczność, cyklosporynę podawano jedynie wybranej grupie chorych [68]. Pod koniec lat 90 opublikowano pierwsze badania, które sugerowały pojawienie się nowego leku – mykofenolanu mofetilu (MMF), który był już od około dziesięciu lat z powodzeniem stosowany u chorych po przeszczepieniu narządów unaczynionych [34, 75]. W ciągu następnych lat pojawiały się kolejne doniesienia, które podkreślały wyższość MMF nad cyklofosfamidem [44, 46, 49, 54, 72, 73, 122]. Z kolei w innych badaniach klinicznych stwierdzano, iż oba leki są równorzędne [58, 69, 70, 90, 91]. Stosowano ponadto różne schematy leczenia nefropatii toczniowej. MMF podawany był jako rodzaj terapii podtrzymującej po indukcji cyklofosfamidem. Niektórzy zaś badacze stosowali mykofenolanu mofetilu w terapii indukcyjnej, ale w tym przypadku dawki leku były większe, czyli 3,0 g na dobę (w dwóch dawkach podzielonych). Badania *Appel i wsp.* [7], opierające się na leczeniu 370 chorych z nefropatią toczniową wykazały jednoznacznie, że cyklofosfamid podawany w postaci pulsów dożylnych jest tak samo efektywny jak mykofenolan mofetilu. Tym samym potwierdził on, że oba leki powinniśmy traktować jako leczenie równorzędne. Na chwilę obecną nie wydaje się, że można jednoznacznie potwierdzić tezę, że MMF jest lepszy od cyklofosfamidu, jak sugerowano w wielu badaniach. Istnieją zatem nadal kliniczne wskazania do leczenia nefropatii toczniowej cyklofosfamidem. Na dodatek w grupie chorych z aktywną nefropatią toczniową i współistniejącą leukopenią poniżej 3 000/mm³, leczenie z zastosowaniem MMF jest przeciwwskazane. W ciągu kilku lat ogłoszone zostaną wyniki badań klinicznych, dotyczące leczenia nefropatii toczniowej nowym rodzajem terapii immunosupresyjnej, tzw. terapią biologiczną: rituksymabem (przeciwciało skierowane przeciw antygenowi CD20 na limfocytach) oraz abataceptem (inhibitorem kostymulacji limfocytów). Do badania wieloośrodkowego, które ma na celu ocenę efektywności wymienionych leków kwalifikowano pacjentów z aktywną nefropatią toczniową, ale z wyłączeniem chorych z wyraźnie obniżoną filtracją kłębuszkową (mierzoną wielkością eGFR). W przypadku pacjentów z nefropatią toczniową nie musi to świadczyć o nieodwracalności zmian w nerkach, lecz może być przejawem bardzo aktywnego procesu zapalnego (m.in. nasilonej proliferacji komórek mezangialnych, odkładania się dużej ilości złogów

kompleksów immunologicznych podśrodkowo). W przypadku takich chorych po leczeniu immunosupresyjnym można uzyskać powrót funkcji nerek do wartości prawidłowych GFR. Do badań klinicznych nie kwalifikowano również chorych z innymi powikłaniami SLE, jak: leukopenia poniżej $3000/\text{mm}^3$ czy też obecność objawów ze strony centralnego układu nerwowego. Nawet jeżeli ten rodzaj terapii biologicznej okaże się efektywny w leczeniu nefropatii toczniowej, to należy zauważyć, że populacja kwalifikowanych do badań chorych była dość zawężona. Zakwalifikowano bowiem do nich pacjentów z generalnie łagodniejszą postacią choroby układowej. Po kilkudziesięciu latach doświadczeń leczenia cyklofosfamidem nefropatii toczniowej nie wydaje się jednak, by można było jednoznacznie stwierdzić, że era leczenia tym lekiem jest poza nami. Większość badaczy skłania się do tezy, że nie posiadamy jednolitego schematu leczenia nefropatii toczniowej oraz, że leczenie takie powinno być indywidualizowane do przypadku danego pacjenta [16, 19, 57, 89, 96, 98, 121, 136]. Dlatego przedmiotem zaprezentowanych badań była ocena efektywności leczenia cyklofosfamidem u chorych z nefropatią toczniową, z jednoczesną próbą odpowiedzi na pytanie, czy można przewidzieć reakcję chorych na ten typ terapii, tak by nie narażać ich na potencjalnie zbędne leczenie cytostatykiem. Badania przeprowadzone w naszym ośrodku opierały się na ocenie wyników badań laboratoryjnych i immunologicznych przed rozpoczęciem leczenia, a następnie w okresie jego kontynuacji.

Przedstawione wyniki badań dotyczą stosunkowo licznej, jak na badanie prowadzone w jednym ośrodku klinicznym, bo 67-osobowej populacji chorych z rozpoznaniem nefropatii toczniowej, u większości badanych potwierdzonej badaniem biopsyjnym nerki. Ponadto u większości – 79% chorych rozpoznawano zespół nerczycowy. Kryterium podziału na dwie grupy chorych: reagujących (RE) i niereagujących (N-RE) wynikał z procentowego spadku wielkości dobowego wydalania białka z moczem. Nie stosowano powszechnie używanego podziału oceny efektywności terapii immunosupresyjnej na całkowitą (wielkość dobowego wydalania białka z moczem $<1,0$ g) lub częściową remisję (wielkość dobowego wydalania białka z moczem $<3,0$ g, a powyżej $1,0$ g) oraz brak efektu leczenia nefropatii toczniowej. Parametrem, który przyjęto za wskaźnik monitorowania wydalania białka z moczem był liczony w procentach stosunek wielkości białkomoczu dobowego w danym miesiącu terapii do wartości sprzed rozpoczęcia leczenia. W grupie badanej, w której zakres proteinurii jest bardzo szeroki, posługiwanie się ilościową oceną dobowego wydalania białka z moczem może powodować znaczne trudności w statystycznym opracowaniu uzyskanych wyników. Oznacza to, że uzyskujemy wyniki wielkości dobowej proteinurii różniące się statystycznie znamienne, np. przed i po leczeniu, ale z punktu widzenia klinicznego wielkość spadku białkomoczu jest za mała, by odnieść korzyść z leczenia. W niektórych pracach badacze posługują się stosunkiem wielkości wydalania białka na gram wydalonej kreatyniny z moczem. Należy zwrócić uwagę, że u pacjentów odwodnionych wyniki takie mogą być fałszywie zawyżone.

Względne dobowe wydalanie białka z moczem, liczone do wartości uzyskanej sprzed leczenia spowodowało [rycina 2], że podzielono badanych na - reagujących (RE), czyli pozytywnie odpowiadających na leczenie cyklofosfamidem oraz na pacjentów niereagujących (N-RE). W czasie sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem w grupie chorych N-RE obserwowano niewielki spadek białkomoczu, średnio nie przekraczający 30%. Przykładowo: pacjent, u którego uzyskano spadek proteinurii z 10,0 g na 2,7 g należał do grupy RE, a pacjent, u którego proteinuria spadła z 4,0 g na 2,7 g należał do grupy N-RE. Według ogólnie przyjętych zasad obydwie przypadki kliniczne kwalifikują się do częściowej remisji nefropatii. Pozytywny efekt leczenia cyklofosfamidem oznaczał wyraźny spadek białkomoczu w okresie pierwszych sześciu miesięcy leczenia. Nawet jeżeli po sześciu miesiącach terapii cyklofosfamidem uzyskiwano sporadycznie spadek białkomoczu o więcej niż 30%, lecz średni spadek w czasie sześciu miesięcy nie przekraczał 30%, kwalifikowano chorych jako niereagujących. W związku z tym, w badanej grupie chorych wyłoniły się dwie podgrupy. W pierwszej u pacjentów RE, u których obserwowano znaczny spadek białkomoczu szczególnie wyraźny po podaniu pierwszych trzech pulsów [rycina 2]. Po drugim miesiącu leczenia spadek białkomoczu wynosił około 50%, a po trzecim miesiącu ten spadek już był około 60%. W przypadku drugiej grupy chorych – N-RE spadek białkomoczu nie występował albo był niewielki. Dodatkowo w czasie pierwszych trzech miesięcy leczenia ulegał jedynie niewielkim zmianom, co odpowiadało obniżeniu białkomoczu około 10-15%. Cyklofosfamid w grupie chorych RE okazał się bardzo efektywnym i prawdopodobnie najlepszym rodzajem terapii immunosupresyjnej. W większości badań, dotyczących leczenia cyklofosfamidem nefropatii toczniowej ocenia się całą populację chorych, nie próbując rozróżnić pacjentów w zależności od efektu leczenia. Populacje chorych z nefropatią toczniową oceniane w badaniach klinicznych wykazują wiele różnic, np. procent chorych z zespołem nerczycowym czy też z obniżoną funkcją nerek [18, 45, 64, 73, 91, 170]. Podkreślał to *Houssiou* [90], że populacja chorych, uczestnicząca w jego badaniu miała łagodniejszą postać nefropatii w porównaniu, np. z badaniami NIH [30, 64, 157]. Wydaje się zatem, że ocena procentowego względnego dobowego wydalania białka z moczem jest w chwili obecnej dobrym wskaźnikiem monitorowania leczenia nefropatii toczniowej, chociaż na pewno nieidealnym. Ponadto wydaje się, że w ocenie efektywności danej terapii immunosupresyjnej dynamika zmian proteinurii lepiej może świadczyć na korzyść określonego rodzaju leczenia niż wielkość białkomoczu w danym momencie badania. Uzyskanie spadku białkomoczu, który kwalifikuje się jako niewielki nie decyduje o efektywności leczenia. Zwłaszcza jeśli dotyczy to grupy badanej, charakteryzującej się obecnością, tzw. białkomoczu nienerczycowego, czyli pomiędzy 1,0 - 3,0 g wydalanego białka z moczem. *Boumpas* wspólnie z *Balow* w pracy opublikowanej w *Lupus 1998* [32], definiując kryteria odpowiedzi (*response*) na leczenie immunosupresyjne używają procentowego spadku białkomoczu. W przypadku występowania

zespołu nerczycowego, by uznać odpowiedź na leczenie spadek białkomoczu powinien wynosić około 50%, a wielkość dobowego wydalania białka z moczem nie mogła przekroczyć 3,0 g. Natomiast jeżeli obecna była nienerczycowa proteinuria, to wielkość białkomoczu dobowego musiała osiągnąć wartości poniżej 1,0 g na dobę. Ponadto wymienione parametry musiały być stabilne przez okres co najmniej sześciu miesięcy. Kryteria odpowiedzi na leczenie, przedstawione przez *Boumpas, Balow* [32] częściowo pokrywają się z kryteriami przyjętymi w niniejszej pracy. Istnieje jednak pewna różnica, spowodowana tym, że w niniejszej pracy posługiwano się nie tylko procentowym spadkiem białkomoczu, ale również dynamiką jego zmian. Średni spadek białkomoczu w czasie sześciu miesięcy leczenia musiał przekroczyć 30%. Wzięto pod uwagę zatem wszystkie wartości w okresie leczenia, a nie tylko wartość białkomoczu po szóstym miesiącu terapii. Chorzy RE zazwyczaj charakteryzowali się znacznie większym, bo 60% spadkiem proteinurii już po trzecim miesiącu terapii cyklofosfamidem. Wydaje się, że wartym podkreślenia jest fakt, że w przypadku oceny kryteriów remisji czy odpowiedzi na leczenie posługujemy się nie tylko pojedynczymi wartościami, ale bierzemy pod uwagę dynamikę ich zmian. Wyraźny spadek proteinurii w czasie pierwszych trzech miesięcy leczenia cyklofosfamidem jest parametrem sprawdzającym, czy przykładowy pacjent został zakwalifikowany do odpowiedniej grupy leczonych. Jak pokazały przedstawione badania nie można posługiwać się jednym parametrem, by ocenić reakcję na leczenie. Zawsze należy wziąć pod uwagę kilka z nich. Oprócz względnego dobowego wydalania białka z moczem bardzo ważnym parametrem efektywności leczenia cyklofosfamidem okazała się erytrocyturia.

U wszystkich badanych przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem stwierdzano obecność erytrocyturii o różnym stopniu nasilenia. Współzależność pomiędzy względnym białkomoczem dobowym a wskaźnikiem Ecyt obserwowano w obydwu grupach chorych, chociaż zdecydowanie wyraźniejszy związek występował u chorych RE [rycina 7]. Wielkość wydalania krwinek czerwonym z moczem jest badaniem półilościowym. Wynik badania podaje zakresy liczby erytrocytów w polu widzenia, przez co trudna staje się jego interpretacja. Ocena statystyczna możliwa jest dopiero po przekształceniu na dane, które przybierają postać funkcji liniowej. Wprowadzenie wskaźnika Ecyt umożliwiło przeprowadzenie statystyki porównawczej. W większości badań dotyczących nefropatii toczniowej obecność erytrocyturii stanowi niezbędne kryterium rozpoczęcia leczenia immunosupresyjnego. W żadnym z opublikowanych dotychczas badań klinicznych erytrocyturia nie jest natomiast używana jako wskaźnik monitorowania efektywności leczenia [44, 45, 73, 90, 91, 111]. Niniejsza praca podkreśla ważność monitorowania erytrocyturii podczas leczenia nefropatii toczniowej oraz stara się udowodnić, że obok białkomoczu stanowi ona prosty wskaźnik monitorowania efektywności leczenia zmian w nerkach w przebiegu toczniowego układowego. Ważna jest nie tylko obecność erytrocyturii, ale przede

wszystkim jej wielkość i dynamika zmian. Powyższe sugestie mogą zapewne dotyczyć chorych z rozpoznaniem także innych nefropatii, nie tylko nefropatii toczniowej. Należy wziąć pod uwagę nefropatię w przebiegu układowych zapaleń naczyń, gwałtownie postępującego kłębuszkowego zapalenia nerek, nefropatii IgA czy kriglobulinemii.

Obecność aktywnego osadu moczu, czyli ilości krwinek czerwonych powyżej 5 w polu widzenia jest jednym z niezbędnych kryteriów w większości aktualnie prowadzonych badań klinicznych, który decyduje o włączeniu chorego do badania. Podkreśla się zatem obecność erytrocyturii jako bardzo ważnego wskaźnika aktywności nefropatii toczniowej. Jednak w większości publikacji naukowych, oceniających leczenie nefropatii toczniowej podaje się erytrocyturie jedynie w opisie charakterystyki badanej grupy chorych [7, 45, 46]. Zwykle określa się liczbę chorych z obecnością aktywnego osadu moczu przed rozpoczęciem leczenia. W badaniu *Appel* [7] po sześciu miesiącach leczenia tylko u 31,4% leczonych MMF i 23,8% leczonych CYC nie obserwuje się aktywnego osadu moczu. W żadnym z ostatnio opublikowanych badań wieloośrodkowych erytrocyturia nie jest przedstawiana jako parametr monitorowania leczenia immunosupresyjnego nefropatii toczniowej. Nie wiadomo nawet czy w przypadku chorych, u których stwierdza się obecność erytrocyturii jest kontynuowane leczenie immunosupresyjne i jaki jest to rodzaj leczenia czy też dawkowanie leków. W większości opracowań rozpoznaje się całkowitą remisję nefropatii w oparciu o dwa wskaźniki: spadek białkomoczu poniżej 1,0 g na dobę oraz prawidłowe stężenie kreatyniny w surowicy (lub eGFR wyliczony według wzoru MDRD). Pozostaje pytanie czy erytrocyturia może być kolejnym bardzo wartościowym wskaźnikiem leczniczym.

Contreras [49] w badaniu opublikowanym w *N Engl J Med 2004* podaje erytrocyturie w formie zakresów. W tym przypadku przed rozpoczęciem leczenia wynosiła ona średnio $10-25 \pm 0-2$ erytrocyty w polu widzenia, a następnie po terapii indukcyjnej wynosiła $1-5 \pm 1-5$ erytrocytów w polu widzenia. Zgodnie z zaleceniem badania klinicznego do grup badawczych pacjenci trafiali losowo, ale przed rozpoczęciem leczenia immunosupresyjnego erytrocyturia była podobna we wszystkich badanych grupach i była średnio stosunkowo wysoka. Po leczeniu indukcyjnym uzyskano wyraźny spadek erytrocyturii, ale zakres wartości wskazuje, że pewna grupa leczonych ma nadal aktywny osad moczu. Nie podano jednak, że jaki to był procent leczonych. Praca ta, jak większość prac opublikowanych w ostatnich latach nie traktuje erytrocyturii jako ważnego parametru monitorowania leczenia. Należy jednak zwrócić uwagę, że w tej pracy celem badań było porównywanie kilku rodzajów leczenia immunosupresyjnego, a nie poszukiwanie wskaźników diagnostyczno-prognostycznych efektywności danej terapii. *Ginzler i wsp.* [73], opisując erytrocyturie podobnie jak *Contreras* [49] posługuje się zakresami danych. Przed rozpoczęciem leczenia - cyklofosamid *versus* MMF wydalanie krwinek czerwonych z moczem podobne jest w obydwu grupach. Po okresie 12 tygodni leczenia immunosupresyjnego w grupie leczonej

MMF erytrocyturia wynosiła $12,53 \pm 19,28$ wpw a w grupie leczonej cyklofosfamidem - $20,22 \pm 94,39$ wpw. Przedstawione w ten sposób dane pokazują jak niejednorodnie były badane grupy. Szczególnie dotyczyło to grupy leczonej CYC, gdzie odchylenie standardowe jest 4,5 krotnie większe od średniej arytmetycznej. Autorka następnie przedstawia erytrocyturę po 24 tygodniach terapii. W przypadku leczonych MMF jej zakres wynosił $5,80 \pm 9,03$ wpw, a u leczonych- CYC $13,90 \pm 64,17$ wpw. Podobnie, jak po 12 tygodniach otrzymane wyniki potwierdzają, że badane grupy są nadal bardzo niejednorodne pod względem erytrocyturii. Wydaje się także, że wydalanie krwinek czerwonych z moczem jest wysokie po stosunkowo długim, bo sześciomiesięcznym leczeniu immunosupresyjnym. W niniejszej pracy wykazano, że po sześciu miesiącach leczenia pulsami cyklofosfamidem erytrocyturia w grupie pacjentów RE była około 3-krotnie niższa niż w badaniu *Ginzler i wsp.* [73] Prawdopodobnie trudna interpretacja badania ilościowego, jakim jest wydalanie krwinek czerwonych z moczem sprawiła, że w większości znanych badań wielośrodkowych pojawia się ten parametr jedynie jako pomocniczy w ocenie efektywności leczenia immunosupresyjnego. Dla przykładu *Moroni i wsp.* [127, 129] podaje nie tylko zakresy erytrocyturii, ale wylicza dodatkowo średnią ich ilość w polu widzenia, która wynosiła około 20 erytrocytów, czyli wartości podobne jak w niniejszej pracy oraz wielu publikacjach. W momencie zakończenia obserwacji tej grupy badanej średnia erytrocyturia wynosi około 15 erytrocytów w polu widzenia, pomimo prawidłowej funkcji nerek. Wykazywała ona nieznamiennie statystycznie wyższe wartości w grupie chorych z niewydolnością nerek [129]. W pracy *Moroni i wsp.* [129] nie podano jednak wartości erytrocyturii dla populacji chorych w okresie remisji nefropatii. Należy zauważyć, że w wielu publikacjach nawrót nefropatii toczniowej definiuje się jako wzrost wydalania białka z moczem, pomijając wydalanie w nim erytrocytów. Jednocześnie niektórzy badacze wymieniają także erytrocyturę, która w przypadku pracy *Boumpas, Balow* [32] wynosiła powyżej 10 krwinek w polu widzenia, czyli była wciąż stosunkowo wysoka. W większości prac, które były publikowane w latach 90 ubiegłego wieku autorzy podawali, że w okresie remisji choroby nie powinna być obecna erytrocyturia. Wzrost jej definiowany jako powyżej 5 krwinek czerwonych w polu widzenia oznaczał natomiast kryterium nawrotu nefropatii. Większość badań opublikowanych na początku tego wieku erytrocyturii nie poświęcała wiele miejsca, jeżeli mamy na myśli ją jako parametr efektywności leczenia. Natomiast obecność erytrocyturii była konieczna, by wdrożyć leczenie immunosupresyjne.

Boumpas, Balow [32] jako pierwsi, w pracy opublikowanej w *Lupus 1998* podają erytrocyturę jako jeden z parametrów remisji nefropatii. Brak erytrocyturii oznacza wartości poniżej 2 erytrocytów w polu widzenia, a wyraźna erytrocyturia to powyżej 5 krwinek w polu widzenia. Natomiast spadek erytrocyturii o 50%, ale musi ona wynosić poniżej 10 erytrocytów w polu widzenia spełnia kryterium znaczącej poprawy. Autorzy proponują dodatkowo kryteria remisji nefropatii.

W tym przypadku remisja nefropatii oznacza brak erytrocyturii. Nawrót nefropatii oznacza wzrost erytrocyturii o co najmniej 50% i musi ona wynosić powyżej 5 krwinek w polu widzenia. Autorzy proponują także kryteria odpowiedzi na leczenie (*response*), czyli: spadek erytrocyturii o 50%, ale powinna ona wynosić poniżej 10 krwinek w polu widzenia, jednocześnie występuje spadek białkomoczu poniżej 50% (ale jego wielkość musi wynosić poniżej 3,0 g na dobę) oraz uzyskanie stabilnej funkcji nerek albo jej poprawy.

W 2006 podgrupa badaczy, zajmująca się nefropatią toczniową przy *American College of Rheumatology* opublikowała w *Arthritis Rheum.* [142] konsensus, dotyczący kryteriów odpowiedzi na leczenie u chorych z nefropatią toczniową typu zmian proliferacyjnych i błoniastych. Prawidłowa odpowiedź (*response*) na leczenie chorego występuje wtedy, gdy w wyniku zastosowanej terapii uzyskuje się prawidłowy – nieaktywny osad moczu (<5 krwinek wpw). Oczywiście przed rozpoczęciem leczenia osad moczu musiał być aktywny, czyli > 5 krwinek czerwonych wpw. Pogorszenie przebiegu nefropatii (*worsened*) oznacza pojawienie się aktywnego osadu moczu, kiedy on wcześniej nie występował. Za aktywne zmiany w moczu grupa badaczy uważa także obecność leukocytów >5 wpw lub wałeczków ziarnistych. W przypadku pojawienia się erytrocyturii jako nowego objawu, muszą być oczywiście wykluczone inne przyczyny jej występowania: krwotoczne zapalenia pęcherza, infekcje, kamica nerkowa czy menstruacja.

Ponadto grupa badaczy w pracy opublikowanej w *Arthritis Rheum.* 2008 [137] zaproponowała wskaźnik aktywności nefropatii, w którym wzięto pod uwagę oprócz białkomoczu i leukocyturii, także erytrocyturie. Obecności wydalania krwinek czerwonych z moczem powyżej 10 wpw przyporządkowano 3 punkty. Wymieniony wskaźnik aktywności miał na celu pomoc w klinicznej ocenie chorego, w pracy natomiast nie sugerowano wskazówek, w jaki sposób wyliczony wskaźnik wpłynąłby na rodzaj leczenia immunosupresyjnego nefropatii.

W bieżącym roku europejska grupa badaczy opublikowała własny konsensus, dotyczący terminologii używanej w ocenie przebiegu nefropatii toczniowej [76]. Zasady oceny wielkości erytrocyturii zostały podtrzymane, czyli o aktywności nefropatii toczniowej świadczy obecność aktywnego osadu moczu > 5 erytrocytów wpw. Jednocześnie zalecono, że u pacjenta z *lupus nephritis* w okresie remisji choroby parametry funkcji nerek, jak: stężenie kreatyniny, osad moczu i wydalanie białka z moczem powinny być monitorowane przynajmniej co trzy miesiące. Grupa badaczy, definiując kryteria odpowiedzi na leczenie czy też nawrotu nefropatii jako jeden z parametrów podaje oczywiście obecność aktywnego osadu w ilości powyżej 5 krwinek czerwonych w polu widzenia. Grupa badaczy nie ocenia wielkości erytrocyturii czy też nie proponuje tego badania jako parametru monitorowania efektywności leczenia nefropatii toczniowej. Kryterium stanowi jej obecność lub jej brak.

Pewien problem, który wydaje się być nie wyjaśnionym do chwili obecnej to klasa V WHO nefropatii toczniowej, czyli nefropatia błoniasta. Tutaj erytrocyturia

nie zawsze jest obecna, a jeżeli występuje to jest niewielka (najczęściej w zakresie od 5 - 10 komórek wpw). Bardzo często natomiast nawrotom nefropatii błoniastej towarzyszy zespół nerczycowy. Przebieg kliniczny nefropatii błoniastej jest łagodniejszy niż postaci proliferacyjnych (III i IV klasa WHO) *lupus nephropathy*. Przede wszystkim mamy na myśli progresję przewlekłej choroby nerek. Tutaj spadek filtracji kłębuszkowej postępuje powoli, niezależnie od utrzymującego się białkomoczu [10, 44, 53]. *Austin, Illei* [11] podkreślają, że chorzy z nefropatią błoniastą słabo reagują na leczenie cyklofosfamidem. Jednak w schematach leczenia tej nefropatii stale wymienia się cyklofosfamid, jako jeden z rodzajów terapii immunosupresyjnej. Ponadto wymienieni powyżej badacze w pracy pogładowej, a dotyczącej właśnie nefropatii błoniastej w SLE, podejmują próbę jej scharakteryzowania. Stwierdzają, że niecharakterystyczna jest tutaj obecność hipokomplementemii, zwykle przeciwciała anty-dsDNA nie występują lub ich stężenie jest nieznacznie podwyższone oraz nie występuje erytrocyturia. W przeciwieństwie do postaci proliferacyjnych, gdzie charakterystyczna jest hipokomplementemia, obecność podwyższonego stężenia przeciwciał anty-dsDNA, erytrocyturia oraz pogorszenie filtracji kłębuszkowej. Gdyby posługiwać się wskaźnikami proponowanymi w tej pracy, to chorych z rozpoznaniem nefropatii błoniastej zakwalifikowano by się do grupy chorych N-RE na cyklofosfamid. Natomiast chorzy z obecnością postaci proliferacyjnych nefropatii toczniowej zaliczono by do grupy pacjentów RE.

Wprowadzenie wskaźnika Ecyt umożliwiło prostszą interpretację erytrocyturii. Wskaźnik Ecyt okazał się parametrem świadczącym o wrażliwości na leczenie cyklofosfamidem, ale dodatkowo parametrem umożliwiającym monitorowanie leczenia immunosupresyjnego. W prezentowanej pracy zmiany Ecyt w dwóch grupach badanych RE i N-RE mają odmienny przebieg w okresie roku leczenia immunosupresyjnego. W przypadku chorych RE obserwuje się spadek wskaźnika, podczas gdy w grupie chorych N-RE wskaźnik Ecyt praktycznie nie ulega zmianom. Zatem u chorych RE po roku terapii nie stwierdza się obecności krwinek czerwonych w moczu. Natomiast u chorych N-RE erytrocyturia jest niewielka, ale stale obecna. Wyrazem potwierdzenia istotności tego wskaźnika jest obecność wysoce znamiennej współzależności pomiędzy wskaźnikiem Ecyt a względnym wydalaniem białka z moczem [rycina 7]. Wydalanie erytrocytów z moczem nie świadczy w sposób bezpośredni o wrażliwości na leczenie cyklofosfamidem, ale jest jednym z parametrów, który ukierunkowuje na wybranie odpowiedniego rodzaju leczenia immunosupresyjnego. Wyniki uzyskane w tej pracy, wskazują, że na pewno obecność wyraźnej erytrocyturii (wskaźnik Ecyt ≥ 2) przy obecności innych wskaźników aktywności choroby pozwala przewidzieć nam pozytywną reakcję na leczenie cyklofosfamidem. Ponadto w grupie chorych RE w ciągu pierwszych trzech miesięcy leczenia pulsami CYC występuje wyraźny spadek wydalania erytrocytów z moczem, potwierdzając w ten sposób wrażliwość na to leczenie. Po roku leczenia immunosupresyjnego w grupie chorych

RE i to niezależnie od rodzaju terapii podtrzymującej nie stwierdza się zwiększonego wydalania krwinek czerwonych z moczem, a wskaźnik Ecyt jest bliski 0. Wydaje się zatem, że erytrocyturia, mierzona jako wskaźnik Ecyt jest bardzo dobrym i przydatnym wskaźnikiem wrażliwości na leczenie cyklofosfamidem. Jednocześnie umożliwia on monitorowanie tej terapii u chorych z nefropatią toczniową. W oparciu o przedstawione w pracy wyniki badań można zasugerować, że ocena erytrocyturii przed i w trakcie leczenia immunosupresyjnego jest tak samo ważnym wskaźnikiem przebiegu nefropatii toczniowej jak ocena wydalania białka z moczem.

Kolejnym parametrem, który wyraźnie odróżniał się pomiędzy grupami chorych pozytywnie reagujących na leczenie cyklofosfamidem lub na to leczenie niewrażliwych były przeciwciała ANA. Wiadomo, iż odgrywają one ważną rolę w diagnostyce tocznia rumieniowatego układowego. W momencie rozpoznania choroby występują w podwyższonych mianach u większości, bo około 95% badanych. Przeciwciała ANA mogą występować także u chorych z rozpoznaniem innych chorób autoimmunologicznych, jak: reumatoidalne zapalenie stawów, samoistna krieglobulinemia, stwardniejące zapalenie dróg żółciowych czy autoimmunologiczne zapalenie wątroby, co poniekąd pomniejsza ich rolę w diagnostyce SLE. Poszczególne klasy przeciwciał przeciwjądrowych występują rzadziej. Należą do nich przykładowo: przeciwciała anty-SSA, anty-SSB, anty-RNP czy przeciwciała anty-Sm, które pomimo tego, że występują rzadko stanowią jedno z kryteriów rozpoznania SLE zgodnie z zaleceniami *American College of Rheumatology*. Spośród grupy przeciwciał przeciwjądrowych na szczególną uwagę zasługują przeciwciała anty-SSA, które mogą być obecne w bardzo wysokim mianie u chorych, u których nie wykrywa się typowych przeciwciał ANA [171, 173]. W tym przypadku ich rola w diagnostyce choroby jest znacząca, bo potwierdza rozpoznanie SLE. Te przeciwciała najczęściej pojawiają się u chorych z SLE oraz nasilonymi zmianami skórnymi. Istnieje grupa chorych z rozpoznaniem nefropatii błoniastej (klasa V WHO), u których stwierdza się obecność tych przeciwciał, a mogą być nieobecne przeciwciała ANA czy anty-dsDNA. Klinicznie obserwuje się zespół nerczycowy z niewielką erytrocyturią (Ecyt ≤ 1 punkta), trudno poddający się leczeniu immunosupresyjnemu.

Przeciwciała skierowane przeciwko rybonukleoproteinie (anty-RNP) występują u chorych z rozpoznaniem mieszanej choroby tkanki łącznej, ale w niewielkim procencie mogą występować u chorych z SLE, podobnie jak inne przeciwciała. Przeciwciała skierowane przeciw natywnemu DNA (nDNA lub dsDNA) uważane są wskaźnik powikłań nerkowych SLE. Podkreśla się nawet, że u chorych z obecnymi we krwi tymi przeciwciałami istnieje wysokie ryzyko rozwoju albo też nawrotu nefropatii. Wiele badań wyraźnie nie potwierdziło takiej tezy, ponieważ u około 20-30% chorych z rozpoznaną aktywną nefropatią toczniową nie stwierdza się obecności tych przeciwciał we krwi [45, 151]. Stąd też ich rola w diagnostyce czy monitorowaniu leczenia nefropatii pozostaje ograniczona. Dlatego też

wydaje się, że przeciwciała ANA mogą odgrywać ważniejszą rolę w diagnostyce SLE ze względu na powszechność ich występowania. W niniejszej pracy dokładnej analizie poddano miano przeciwciał ANA, które podwyższone miano u 62 na 67 badanych (93%). W grupie 14 chorych z białkomoczem nienerczycowym miano ANA było wyraźnie podwyższone u wszystkich badanych pacjentów. Wprowadzenie wskaźnika ANA umożliwiło przeprowadzenie znacznie prostszej analizy statystycznej, która byłaby trudna, gdyby posługiwano się wielkością miana tych przeciwciał. Wyniki miana przeciwciał ANA mają przebieg funkcji wykładniczej. Wyrazem tego jest bardzo duży rozrzut wielkości danych, co utrudnia ich statystyczne opracowanie. Stało się to możliwe dopiero po przekształceniu wyników miana ANA na wskaźnik ANA w punktach. Tak przetworzone wyniki mają charakter zależności liniowych, co pozwala na wykorzystanie prostszych metod statystycznych. W naszych badaniach dwie grupy chorych różniły się pomiędzy sobą wielkością wskaźnika (także miana) ANA. U pacjentów, którzy pozytywnie reagowali na leczenie cyklofosfamidem obserwowaliśmy wyraźnie wyższe zarówno miano ANA, jak i wartość wskaźnika ANA przed rozpoczęciem terapii. Dodatkowo podczas leczenia cyklofosfamidem u pacjentów RE uzyskano spadek tych przeciwciał do wartości, które obserwowano na początku leczenia u chorych N-RE. Natomiast w grupie pacjentów N-RE w okresie pierwszych sześciu miesięcy leczenia nie obserwowano zmian w wielkości wskaźnika ANA i dopiero w następnych miesiącach uzyskano niewielki ich spadek. U chorych N-RE a leczonych innymi lekami immunosupresyjnymi spadku tego wskaźnika nie obserwowano. Należy zwrócić uwagę, że po sześciu miesiącach i po roku leczenia immunosupresyjnego wskaźnik ANA pozostawał podobny w obydwu leczonych grupach chorych. Możemy zatem zasugerować, że przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem pacjenci RE charakteryzowali się większą aktywnością immunologiczną choroby, co wiązało się z występowaniem wyższego miana przeciwciał i wskaźnika ANA oraz niższego stężenia składowej C3 dopełniacza. Wielu badaczy uważa, że ANA nie odgrywają zasadniczej roli w monitorowaniu leczenia SLE. Wprowadzenie podziału na dwie grupy chorych RE i N-RE pokazało, że ANA mogą być traktowane jako wskaźnik monitorowania leczenia, ale dotyczyło to grupy pacjentów RE. Wiele publikowanych badań klinicznych, w których oceniano różne rodzaje leczenia nefropatii toczniowej odnosiło się do całej populacji badanych. Niestety trudno znaleźć prace, w których porównano by populacje chorych, którzy reagowali pozytywnie na CYC, z tymi, którzy na to leczenie nie reagowali. We wspomnianym już wcześniej badaniu *Contreras i wsp.* [49] autor obserwował wyższe miano ANA przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem w porównaniu do wyników, które uzyskał w momencie rozpoczęcia terapii podtrzymującej. Autor podaje zakresy wyników miana ANA i medianę. Nie podejmuje próby ich interpretacji. Podobna obserwacja dotyczy przeciwciał anty-dsDNA, których miano również obniża się po leczeniu indukcyjnym cyklofosfamidem. Bardzo duży rozrzut wyników uniemożliwia osiągnięcie precyzyjnych wniosków.

Odchylenia standardowe są bowiem większe od wartości wyniku średniej z badań w danej grupie. *Appel i wsp.* [7], analizując wyniki badania wielośrodkowego podaje jedynie jaki procent badanych miał podwyższone miano anty-dsDNA przed, a jaki po leczeniu. W badaniach opublikowanych w ostatnich latach nie zwracano szczególnej uwagi na wyniki badań przeciwciał przeciwjądrowych. Wydaje się, że ten brak uwagi spowodowany był faktem, że uzyskiwano bardzo szeroki rozrzut danych, ponieważ jak napisano powyżej miano ANA zmienia się wykładniczo, a nie liniowo. Wprowadzenie wskaźnika ANA zwróciło uwagę, że ANA mogą jednak odgrywać rolę w diagnostyce i monitorowaniu leczenia immunosupresyjnego u chorych z nefropatią toczniową. Należy podkreślić, że wskaźnik ANA uległ wyraźnemu obniżeniu u chorych RE. Natomiast w grupie pacjentów N-RE wskaźnik ANA praktycznie nie uległ zmianie. Może zatem mamy do czynienia z dwiema populacjami chorych z nefropatią toczniową, które różnią się stężeniem przeciwciał przeciwjądrowych, a co zapewne jest związane z aktywnością immunologicznego procesu chorobowego. W jednej z tych populacji miano ANA ulega obniżeniu po leczeniu lub utrzymuje się na wyższym poziomie około 1:640. Kolejna grupa chorych z SLE charakteryzuje się występowaniem od początku niższego miana ANA, które nie zmienia się lub nieznacznie obniża po leczeniu. Wydaje się, że rola przeciwciał ANA diagnostyce czy monitorowaniu leczenia immunosupresyjnego w SLE nie pozostaje do chwili obecnej wyjaśniona i wymaga dalszych badań.

Obniżenie stężenia składowej C3 dopełniacza obserwuje się u większości chorych w okresie aktywnej choroby układowej i bardzo często u chorych z aktywną nefropatią toczniową. Niskie stężenie składowej C4 dopełniacza zdecydowanie rzadziej występuje u pacjentów z aktywną postacią SLE. Dotyczy przede wszystkim chorych, u których stwierdza się w surowicy obecność krioglobulin. U większości badanych opisanych w tej pracy, niezależnie od tego czy należeli do grupy RE, czy N-RE obserwowano obniżenie stężenia C3 dopełniacza, przy czym niższe stężenia były u chorych RE. Stężenie składowej C3 okazało się najmniej wyraźnym parametrem, odróżniającym dwie grupy badanych. Jego stężenie wzrastało po leczeniu cyklofosfamidem, zarówno u chorych RE i N-RE i utrzymywało się na stabilnym poziomie identycznym w obu grupach pacjentów. W całej grupie 67 pacjentów z rozpoznaniem SLE stężenie C3 w okresie remisji choroby było na granicy dolnego zakresu wartości referencyjnych (około 0,9 g/l). Po sześciomiesięcznym leczeniu cyklofosfamidem czy po roku leczenia immunosupresyjnego stężenie C3 było podobne w obydwu grupach chorych RE i N-RE. Różnica pomiędzy stężeniem C3 przed i po sześciu miesiącach leczenia ($\Delta C3$) była zdecydowanie wyższa w grupie chorych RE w porównaniu z N-RE. Obniżenie C3 jako kryterium aktywności choroby jest podkreślane w wielu publikacjach [7, 30, 45, 73, 90]. Jednak nie jest parametrem, który dotyczy całej populacji chorych z aktywną nefropatią czy aktywną chorobą układową. Stanowi jedno z badań pomocniczych w ocenie aktywności choroby. Należy zauważyć,

że u pacjentów z rozpoznaniem SLE w okresie remisji choroby średnie stężenie C3 utrzymuje się w dolnych zakresach wartości prawidłowych. W całej populacji pacjentów z SLE istnieje grupa chorych, u których stężenie C3 pozostaje poniżej dolnego zakresu wartości prawidłowych i niekoniecznie niskie stężenie C3 oznacza dużą aktywność choroby układowej. Obecność niskich stężeń C3 w surowicy oraz wysokiego miana przeciwciał ANA może nam wskazywać na dużą aktywność choroby układowej u danego pacjenta. Wydaje się jednak, że ważniejsza jest dynamika zmian stężenia C3 u chorych leczonych immunosupresyjnie i podobnie dynamika zmian miana ANA. W tym przypadku ocena polega na obserwacji, czy stężenie to ulega wzrostowi po leczeniu oraz jakie osiąga wartości. Istnieje grupa chorych z SLE z wrodzonym niedoborem C3 dopełniacza, u których pomimo leczenia immunosupresyjnego stężenie C3 pozostaje na niezmiennym poziomie. Wówczas ten parametr nie jest dobrym wskaźnikiem aktywności choroby. Wiadomo także, że u chorych z SLE stwierdza się obecność kompleksów immunologicznych wiążących składową dopełniacza C1q a nie C3d. Nie obserwuje się wówczas niskich stężeń C3, pomimo klinicznych objawów aktywności choroby. Otrzymane wyniki badań, przedstawione w tej pracy są porównywalne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy. W badaniu *Contreras i wsp.* [49] średnie stężenie C3 przed leczeniem cyklofosfamidem wynosiło około 0,6-0,65 g/l, a po leczeniu indukcyjnym około 0,9-1,0 g/l. W badaniach *Moroni i wsp.* [127, 129] stężenie C3 przed leczeniem wynosiło około 0,5 g/l, czyli było nieco niższe, ale autorka za dolną granicę wartości prawidłowych C3 przyjmuje wartość 0,8 g/l, co może tłumaczyć tę niewielką różnicę w średnim stężeniu C3 przed rozpoczęciem leczenia. Jedynie w badaniu *Chan* [45] średnie stężenie C3 przed leczeniem wynosiło 0,46-0,54 g/l i było tuż poniżej dolnego zakresu wartości referencyjnych - 0,6 g/l, chociaż według autora u 69% badanych stężenie C3 było poniżej normy. Po leczeniu stężenie C3 wzrosło do wartości średnio około 0,85-0,93 g/l, czyli do wartości prawidłowych. Mała liczebność grupy - w badaniu brało udział 42 chorych może tłumaczyć różnicę, ale też fakt, że mamy do czynienia z odmienną populacją chorych, w tym przypadku rasą żółtą. *Houssiou* [91] porównywał dwie grupy chorych z *lupus nephritis* w zależności od utrzymania odległej prawidłowej funkcji nerek. Przed rozpoczęciem leczenia stężenia C3 wynosiły odpowiednio 0,56 i 0,54 g/l, a po sześciu miesiącach leczenia 0,86 g/l i 0,79 g/l, podobne w obydwu grupach i to niezależnie od końcowego efektu leczenia. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy. Stężenie składowej dopełniacza C3 wzrastało do wartości, które dla chorych z SLE możemy uznać za wartości prawidłowe. Porównując wyniki chorych z SLE z wynikami stężenia C3 u zdrowej populacji, można powiedzieć, że wartości te znajdują się przy dolnej granicy zakresu wartości referencyjnych dla zdrowej populacji. W obydwu badanych grupach chorych RE i N-RE obecny był wzrost stężenia C3, nawet u pacjentów, którzy nie zareagowali na leczenie immunosupresyjne. Stężenie C3 przed rozpoczęciem leczenia może być jednym z pomocniczych parametrów, pozwalających na ocenę

aktywności choroby. Należy jednak podkreślić, że w porównaniu ze wskaźnikami Ecyt i ANA zdaje się on być zdecydowanie mniej przydatnym. U pacjentów z rozpoznaną aktywną nefropatią toczniową mamy do czynienia z różnym obrazem parametrów immunologicznych. Prawidłowa ich interpretacja, przede wszystkim poprzez obserwację dynamiki zmian poszczególnych parametrów u konkretnego badanego ma największe znaczenie. Prowadzi to do konkluzji, że w monitorowaniu efektywności leczenia należy wykonywać szereg badań immunologicznych w ustalonych odstępach czasu.

Połączenie dwóch parametrów najwyraźniej odróżniających pacjentów RE od N-RE w jeden wskaźnik ANA+Ecyt pozwoliło na jeszcze wyraźniejsze zróżnicowanie obu grup. Połączenie trzech parametrów we wskaźnik [ANA+Ecyt]/C3 podobnie nasiliło różnicę pomiędzy dwiema grupami. Jednak w przypadku tego ostatniego wskaźnika różnica pomiędzy grupami chorych RE i N-RE jest mniej zaznaczona. Posługując się wskaźnikami: Ecyt, ANA oraz ANA+Ecyt możemy przewidzieć reakcję chorego na leczenie cyklofosfamidem. Wskaźnik Ecyt wynoszący ≥ 2 punktów czy też wskaźnik ANA+Ecyt o wartości 4 punktów i powyżej wyraźnie wskazują na wrażliwość na leczenie CYC. W przypadku pacjentów, którzy mogą nie reagować na leczenie cyklofosfamidem wskaźnik Ecyt najczęściej wynosił 1 i poniżej, a ANA+Ecyt poniżej 3 punktów. Wskaźnik ANA+Ecyt wynoszący około 3 - 3,5 punktów był graniczny dla obydwu grup chorych i w tym przypadku, można dodatkowo posługiwać się wskaźnikiem [ANA+Ecyt]/C3. Dwa złożone wskaźniki wskazywały, że prawdopodobnie mamy do czynienia z dwiema odrębnymi grupami chorych o odmiennej wrażliwości na leczenie cyklofosfamidem. Należy pamiętać, że w praktyce klinicznej możemy spotkać się z przypadkami chorych, o których trudno będzie definitywnie rozstrzygnąć, do której z badanych grup pacjentów należą – RE czy N-RE. Obecność erytrocyturii i jej nasilenie jest cechą typową dla chorych RE. Podobnie przedstawione powyżej zachowanie się dynamiki jej zmian. Po sześciu miesiącach leczenia obserwuje się spadek wskaźnika ANA+Ecyt u chorych RE. W grupie pacjentów N-RE ten wskaźnik w tym czasie praktycznie nie ulega zmianom. Wyraźny znamieny statystycznie spadek wskaźnika ANA+Ecyt u chorych RE oznacza, że obserwuje się spadek wskaźnika Ecyt i wskaźnika ANA. Wskaźnik Ecyt zmienia się w okresie, nie tylko sześciu miesięcy, ale i całego roku terapii immunosupresyjnej. Natomiast wskaźnik ANA obniża się głównie w okresie pierwszych sześciu miesięcy leczenia. W wyniku leczenia immunosupresyjnego uzyskano spadek przeciwciał ANA do pewnego poziomu. W okresie późniejszym niezależnie od prowadzonego leczenia immunosupresyjnego nie stwierdza się spadku wskaźnika czy też miana ANA. Wskaźniki: ANA, Ecyt oraz ANA+Ecyt i [ANA+Ecyt]/C3 umożliwiają nam przewidywanie reakcji chorego na leczenie cyklofosfamidem. Natomiast już w okresie prowadzenia terapii immunosupresyjnej, obok wydalania białka z moczem, najlepszym parametrem monitorowania leczenia jest wskaźnik Ecyt, który podlega zmianom w okresie całego roku leczenia w grupie chorych

RE. Wskaźniki ANA+Ecyt i [ANA+Ecyt]/C3 po sześciu miesiącach leczenia cyklofosfamidem są podobne w dwóch grupach chorych RE i N-RE. Potwierdza to tylko fakt, że te wskaźniki mogą odgrywać ważną rolę prognostyczną w momencie rozpoczynania leczenia u chorych z aktywną chorobą układową.

Poddając ocenie szereg różnych wskaźników aktywności nefropatii toczniowej raz jeszcze należy zauważyć, że grupa badanych chorych dzieli się na dwie populacje, które różnią się wielkością erytrocyturii oraz ogólnie mówiąc aktywnością immunologiczną choroby, mierzoną wielkością ANA i stężeniem C3 dopełniacza. W grupie pacjentów aktywniejszych immunologicznie – RE użykuje się spadek wskaźników aktywności choroby do pewnego poziomu, który już w późniejszym okresie nie podlega zmianom. W drugiej grupie badanych, którzy charakteryzują się mniejszą aktywnością immunologiczną choroby, również niższą erytrocyturią - N-RE, wskaźniki przebiegu choroby utrzymują się na pewnym stałym poziomie. Podobna obserwacja dotyczy także erytrocyturii. Można jedynie przypuszczać, że są to rzeczywiście dwie odmienne populacje chorych. W drugim przypadku, kiedy można założyć, że leczenie cyklofosfamidem nie da pożądanego efektu, prawdopodobnie ta grupa chorych powinna otrzymywać inne leczenie, np. mykofenolan mofetilu. Niniejsza praca nie daje możliwości potwierdzenia tego przypuszczenia, gdyż grupa leczona MMF była bardzo mała (7 chorych). Na dodatek to leczenie wspomniani pacjenci otrzymywali dopiero po sześciomiesięcznej terapii cyklofosfamidem. Jak wspomniano szereg badań, gdzie większość stanowiły badania wieloośrodkowe miały na celu porównanie dwóch rodzajów leczenia, np.: cyklofosfamid *versus* mykofenolan mofetilu. Poszukiwano tam odpowiedzi na pytanie, który z wymienionych leków jest bardziej efektywny. Natomiast w badaniach nie stawiano pytania, u których chorych badany lek jest najbardziej efektywny. W obecnej pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, kiedy leczenie CYC może przynieść efekt najkorzystniejszy. Jak już wspomniano we wstępie na chwilę obecną nie istnieje jedna metoda leczenia w nefropatii toczniowej. Znanych jest co najmniej kilka badań wieloośrodkowych, w których stosowano różne leki, zarówno w terapii indukcyjnej, jak i w leczeniu podtrzymującym. Niektóre badania wypadły pozytywnie przede wszystkim na korzyść MMF. Przykładem takiego badania jest praca *Ginzler i wsp.* [73], w której przedstawiono po 24 tygodniach leczenia niewiarygodnie dobre wyniki w grupie przyjmującej MMF. We wspomnianym badaniu *Appel i wsp.* [7] cyklofosfamid *versus* MMF okazały się równorzędne. Zalecenia europejskich badaczy o leczeniu indukcyjnym nefropatii toczniowej dotyczą podawania CYC w postaci dożylnych pulsów i MMF jako leczenia równorzędnego. Wybór rodzaju leczenia indukcyjnego powinien być dostosowany indywidualnie do każdego chorego. Należy wziąć pod uwagę: poprzednie nawroty nefropatii, odpowiedź na leczenie w przeszłości oraz rodzaje wcześniej stosowanych terapii. Leczenie indukcyjne powinno się stosować przynajmniej 3 miesiące, w przypadku utrzymywania się nadal aktywności choroby można je

wydłużyć do 6 miesięcy. Na chwilę obecną nie podano konkretnych wskaźników określających, który z wymienionych leków powinniśmy zastosować w leczeniu indukcyjnym. Niniejsza praca podejmuje próbę znalezienia subpopulacji w grupie chorych z aktywną nefropatią toczniową, którzy będą najlepiej reagować na leczenie cyklofosfamidem. Wydaje się, że w tej grupie chorych cyklofosfamid powinien być zalecany jako leczenie pierwszego rzutu.

Obok opisanego efektu leczenia immunosupresyjnego cyklofosfamidem nefropatii w przebiegu SLE, ważna jest również odpowiedź na inne pytanie, czy poprawiają się inne funkcje organizmu w tej chorobie. Pierwsze pytanie dotyczy oceny funkcji nerek, którą w pracy oparto o najprostsze wskaźniki: stężenie kreatyniny w surowicy i klirens endogennej kreatyniny oznaczany z dobowej zbiórki moczu. W grupie pacjentów RE zaobserwowano spadek stężenia kreatyniny oraz wzrost klirensu kreatyniny endogennej w okresie leczenia immunosupresyjnego. Ponadto uwidocznił się wyraźny związek pomiędzy względnym spadkiem wydalania białka z moczem a spadkiem stężenia kreatyniny w surowicy w tej grupie badanych. Ten fakt podkreśla efektywność leczenia cyklofosfamidem i jego pozytywny wpływ na poprawę funkcji nerek w grupie pacjentów RE. Takiej obserwacji nie zauważono u pacjentów N-RE. Pomimo długiego rocznego leczenia immunosupresyjnego nie uzyskano poprawy funkcji nerek u chorych N-RE, a stężenie kreatyniny utrzymywało się na stabilnym poziomie średnio około 1,4 mg/dl. Należy jednak zauważyć, że w tej grupie badanych pomimo słabego lub braku efektu leczenia immunosupresyjnego nie zaobserwowano wyraźnego pogorszenia funkcji nerek, biorąc pod uwagę całą grupę chorych N-RE. W pojedynczych przypadkach klinicznych doszło wręcz do pogorszenia funkcji nerek, co jednak nie przekładało się na wynik oceny całej 20-osobowej grupy chorych. Pomimo utrzymywania się dużego białkomoczu, erytrocyturii w ciągu roku obserwacji nie dochodzi do znacznego pogorszenia funkcji nerek w grupie N-RE. Zatem jednoznacznie nie można stwierdzić, że leczenie to nie miało znaczenia lub było całkowicie nieefektywne. Można bowiem przypuszczać iż, w przypadku niezastosowania żadnego leczenia immunosupresyjnego w krótkim okresie czasowym doszłoby do znacznego pogorszenia funkcji nerek i konieczności rozważenia terapii nerkozastępczej. Jednak z drugiej strony, gdyby zastosowano od początku inny rodzaj leczenia immunosupresyjnego, np. mykofenolanem mofetilu może wyniki terapii byłyby lepsze w porównaniu z wynikiem leczenia cyklofosfamidem. Jednak w okresie sześciu miesięcy leczenia mykofenolanem mofetilu 7 chorych, a uprzednio leczonych cyklofosfamidem, nie zaobserwowano ewidentnego spadku białkomoczu. Leczenie było mimo to kontynuowane.

W większości badań wraz ze spadkiem wydalania białka z moczem uzyskiwano poprawę funkcji nerek. Utrzymujący się zespół nerczycowy był najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za progresję niewydolności nerek [6, 15, 91, 127, 138]. U pacjentów, u których w wyniku leczenia immunosupresyjnego uzyskano częściową remisję nefropatii, czyli spadek białkomoczu poniżej 3,0 g, ale

powyżej 1,0 g na dobę często obserwowano nawroty zespołu nerczycowego oraz stopniowe dochodzenie do spadku GFR i wzrostu stężenia kreatyniny w surowicy. Pozytywny efekt leczenia cyklofosfamidem rozumiany jest jako uzyskanie spadku wielkości dobowego wydalania białka z moczem poniżej 1,0 g oraz stabilnej prawidłowej funkcji nerek mierzonej poprzez prawidłowe stężenie kreatyniny w surowicy i eGFR powyżej 60 ml/min. Po roku leczenia immunosupresyjnego w grupie chorych RE były spełnione te dwa warunki oraz dodatkowo nie stwierdzano erytrocyturii. Podobne obserwacje podaje Houssiou, który za najlepszy wskaźnik utrzymania odległej funkcji nerek uważał spadek białkomoczu poniżej 1,0 g na dobę po leczeniu immunosupresyjnym aktywnej nefropatii toczniowej.

Osobnego omówienia wymaga zachowanie się gospodarki białkowo-lipidowej badanych pacjentów w okresie leczenia immunosupresyjnego. Przed rozpoczęciem leczenia cyklofosfamidem stężenie białka całkowitego i albuminy w surowicy było podobne w obydwu grupach chorych RE i N-RE. Nasilenie zaburzeń białkowych oraz lipidowych było związane z traceniem białek z moczem. Badane grupy nie różniły się pomiędzy sobą wielkością proteinurii. W efekcie leczenia immunosupresyjnego w grupie pacjentów RE znaczącemu spadkowi wielkości dobowego wydalania białka z moczem, towarzyszył wyraźny wzrost stężenia białka całkowitego i albuminy w surowicy. Wzrost ten był szczególnie zaznaczony w okresie pierwszych sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem. Następnie utrzymywał się na stabilnym prawidłowym poziomie. Wyrównanie się zaburzeń białkowych było kolejnym wskaźnikiem pozytywnego efektu leczenia cyklofosfamidem. W opublikowanych w ostatnich latach badaniach wielośrodkowych jedynym parametrem gospodarki białkowej brany pod uwagę było stężenie albuminy w surowicy [7, 45, 49, 90]. Wzrost stężenia albuminy, będący wynikiem spadku białkomoczu jest podobny, jaki obserwowano w przedstawionych badaniach.

W grupie pacjentów N-RE dynamika zmian gospodarki białkowej miała odmienny przebieg. Spadek białkomoczu nie okazał się na tyle duży, by towarzyszyła temu wyraźna poprawa podstawowych parametrów gospodarki białkowej. Zaobserwowano jednak w tej grupie powolny wzrost stężenia albuminy w surowicy, podczas gdy stężenie białka całkowitego w surowicy wzrastało jedynie w okresie pierwszych trzech miesięcy terapii. Można jedynie przypuszczać, że ten wzrost stężenia albuminy w surowicy u pacjentów N-RE jest wynikiem zmniejszenia jej wydalania z moczem. Pośrednio może to świadczyć o małym, ale obecnym efekcie immunosupresyjnym leczenia cyklofosfamidem. Wzrostowi stężenia albuminy nie towarzyszył wzrost stężenia białka całkowitego. Ponadto w grupie chorych N-RE obserwowano niższe stężenie IgG w porównaniu z chorymi RE i, które to obniżało się w trakcie leczenia. Prawdopodobnie ten brak wzrostu stężenia białka całkowitego w surowicy u chorych N-RE można tłumaczyć także traceniem IgG z moczem. Wymaga to przeprowadzenia dalszych badań, chociaż pojawiały się doniesienia naukowe, które zwracały uwagę na to zjawisko. Obserwowano to

mi.n. u chorych z obecnością zmian typu błoniastego, gdy stwierdza się obecność kompleksów immunologicznych układających się podnabłonkowo [11]. Typowym przykładem jest nefropatia błoniasta – klasa V WHO, ale dotyczyć to może także chorych, u których współistnieją różne typy zmian - błoniaste i proliferacyjne. Częściej to zjawisko obserwowano u chorych podczas nawrotów nefropatii toczniowej.

Podstawowe parametry gospodarki lipidowej: stężenie cholesterolu i trójglicerydów nie podlegały tak wyraźnym zmianom, jakie obserwowano w przypadku omówionych powyżej zaburzeń białkowych. Po sześciu miesiącach leczenia w grupie pacjentów RE uzyskano znamiennej statystycznie spadek stężenia trójglicerydów. Dopiero po roku leczenia immunosupresyjnego zaobserwowano również znamienne spadek stężenia cholesterolu całkowitego. W grupie pacjentów RE, w przypadku których zespół nerczycowy rozpoznawano u większości badanych, nie obserwowano wysokiej hipercholesterolemii. Na nieobecność typowych dla zespołu nerczycowego zaburzeń lipidowych prawdopodobnie ma wpływ wiele czynników, a jednym z nich może być utrata apetytu i spadek masy ciała, czyli niespecyficzne objawy aktywnej choroby układowej. Z drugiej strony leczenie immunosupresyjne w postaci przewlekłej steroidoterapii wpływa na wzrost stężenia lipidów, m.in. poprzez wzrost masy ciała, prowadzący u niektórych pacjentów nawet do otyłości z objawami zespołu metabolicznego. W grupie pacjentów N-RE stężenie cholesterolu i trójglicerydów nie ulegało wyraźnym zmianom przez rok leczenia immunosupresyjnego. Wydaje się zatem, że nasilenie zaburzeń lipidowych w momencie rozpoczęcia terapii immunosupresyjnej nefropatii toczniowej nie jest czynnikiem decydującym o efektywności tego leczenia. Niektórzy badacze uważają, że występowanie wyraźnej hiperlipidemii czy hipoproteinemii przed rozpoczęciem leczenia immunosupresyjnego jest jednym z czynników decydujących o wrażliwości na leczenie immunosupresyjne [52, 120]. Zarówno w niniejszej pracy czy w badaniach *Houssiou* [90, 91] i *NIH* [30, 64, 87, 93] nie znaleziono potwierdzenia tej tezy.

Podsumowanie

Cyklofosfamid pozostaje nadal bardzo dobrym i efektywnym lekiem w terapii aktywnej nefropatii toczniowej, niezależnie od kilkudziesięciu lat jego stosowania. Wydaje się, że istnieje grupa chorych, która wykazuje się wysoką wrażliwością na to leczenie. Dotyczy to pacjentów z objawami bardzo aktywnej nefropatii i podobnie aktywnej choroby układowej. Pacjenci, którzy pozytywnie reagują na cyklofosfamid charakteryzują się obecnością wyraźnej erytrocyturii (wynoszącej około 20 erytrocytów w polu widzenia) oraz wysokim mianem przeciwciał ANA, a dodatkowym wskaźnikiem pomocniczym są niskie stężenia składowej C3 dopełniacza. W oparciu o ocenę wskaźników: Ecyt, ANA oraz ANA+Ecyt można przewidzieć reakcję chorego na cyklofosfamid. Ocena wymienionych wskaźników ma na celu przede wszystkim wyróżnienie w grupie chorych z nefropatią

tocznią tych pacjentów, w przypadku których pozytywny efekt jest mało prawdopodobny, by nie narażać ich na leczenie cytostatykiem. Monitorowanie efektywności leczenia nefropatii toczniowej opiera się na ocenie względnego wydalania białka z moczem i wielkości erytrocyturii, mierzonej wskaźnikiem Ecyt. W grupie chorych pozytywnie reagujących (RE) na leczenie cyklofosfamidem najbardziej wyraźne zmiany w wielkości białkomoczu i erytrocyturii obserwuje się w okresie pierwszych trzech miesięcy leczenia. Po roku leczenia immunosupresyjnego u chorych RE obserwuje się niewielki białkomocz poniżej 1,0 g na dobę i nie stwierdza się obecności aktywnego osadu moczu. W grupie chorych niereagujących na leczenie cyklofosfamidem obserwuje się jedynie niewielki spadek białkomoczu dobowego - około 20% wartości sprzed leczenia oraz nie obserwuje się spadku erytrocyturii. W monitorowaniu efektywności terapii cyklofosfamidem kolejnym przydatnym badaniem jest również miano ANA, mierzone wielkością wskaźnika ANA. Szczególne znaczenie prognostyczne wykazuje łączony wskaźnik ANA+Ecyt, który może być używany także w monitorowaniu terapii cyklofosfamidem. W grupie chorych niereagujących (N-RE) na leczenie cyklofosfamidem w okresie roku leczenia immunosupresyjnego nie uzyskuje się spadku wskaźnika Ecyt, wskaźnika ANA oraz ANA+Ecyt. Wydaje się, że osoby, które zaliczono na podstawie opracowanych wskaźników do grupy pacjentów niereagujących na terapię cyklofosfamidem winny mieć od początku podjętą próbę innego leczenia immunosupresyjnego, np. mykofenolan mofetilu, terapia biologiczna lub inne.

6. WNIOSKI

Na podstawie wyników badań przedstawiono następujące wnioski:

1. W populacji pacjentów z aktywną nefropatią toczniową istnieje duża grupa chorych, charakteryzująca się wrażliwością na leczenie cyklofosfamidem oraz druga podgrupa osób niereagująca na tego typu terapię.
2. Zaproponowane proste wskaźniki aktywności nefropatii toczniowej: Ecyt – jako wskaźnik erytrocyturii oraz ANA jako wskaźnik miana przeciwciał przeciwnądrowych zdają się być przydatne w przewidywaniu wrażliwości pacjentów na leczenie cyklofosfamidem.
3. Szczególne znaczenie prognostyczne wykazuje łączony wskaźnik ANA+Ecyt, który pozwala również na monitorowanie terapii cyklofosfamidem.
4. Względna wielkość dobowego wydalanie białka z moczem mierzona jako procentowy stosunek do wartości sprzed leczenia i wskaźnik Ecyt są najlepszymi równorzędnymi parametrami monitorowania leczenia cyklofosfamidem chorych z nefropatią toczniową.
5. Pośród pacjentów, którzy na podstawie opracowanych wskaźników zaliczono do grupy dobrze reagujących na leczenie uzyskano pełną remisję choroby w trakcie rocznej terapii immunosupresyjnej.
6. Wydaje się, że osoby zaliczane na podstawie opracowanych wskaźników do grupy niereagujących na terapię cyklofosfamidem winny mieć *a priori* podjętą próbę innego niż cyklofosfamid leczenia immunosupresyjnego (mykofenolan mofetilu, terapia biologiczna lub inne).

7. PIŚMIENNICTWO

1. Ad Hoc Working Group on Steroid-Sparing Criteria in Lupus: Criteria for steroid-sparing ability of interventions in systemic lupus erythematosus: report of a consensus meeting. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 11, 3427–3431.
2. Allison A.C., Eugui E.M.: Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil. *Clin. Transplantation* 1996, 10, 77–84.
3. Andreoli S.P.: Renal manifestations of systemic diseases. *Semin. Nephrol.* 1998, 18, 3, 270–279.
4. Appel A.S., Appel G.B.: An update on the use of mycophenolate mofetil in lupus nephritis and other primary glomerular diseases. *Nat. Clin. Prac. Nephrol.* 2009, 5, 3, 132–142.
5. Appel G.B.: Cyclophosphamide therapy of severe lupus nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 30, 6, 872–878.
6. Appel G.B., Cohen D.J., Pirani C.I., Meltzer J.I., Esters D.: Long-term follow-up of patients with lupus nephritis: a study based on the classification of the World Health Organization. *Am. J. Med.* 1987, 83, 877–885.
7. Appel G.B., Conteras G., Dooley M.A., Ginzler E.M., Isenberg D., Jayne D., Li L.S., Mysler E., Sanchez-Guerrero J., Solomons N., Wofsy D., and Aspreva Lupus Management Study Group: Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction treatment of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 1103–1112.
8. Appel G.B., Radhakrishnan J., D’Agati V.: Systemic lupus erythematosus. W: Brenner B.M. (red.): *The Kidney.* W.B. Sanders Philadelphia 2000, s. 1350–1365.
9. Austin H.A.: Clinical evaluation and monitoring of lupus kidney disease. *Lupus* 1998, 7, 618–621.
10. Austin H.A., Illei G.G.: Membranous lupus nephritis. *Lupus* 2005, 14, 65–71.
11. Austin H.A., Illei G.G., Braun M.J., Balow J.E.: Randomized, controlled trial of prednisone, cyclophosphamide, and cyclosporine in lupus membranous nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 4, 901–911.
12. Austin H.A., Klippel J.H., Balow J.E., le Riche N.G., Steinberg A.D., Plotz P.H., Decker J.L.: Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N. Engl. J. Med.* 1986, 314, 10, 614–619.
13. Badid C., Desmouliere A., Laville M.: Mycophenolate mofetil: implications for the treatment of glomerular disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16, 1752–1756.
14. Balow J.E.: Choosing treatment for proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, 8, 1981–1983.
15. Balow J.E.: Clinical presentation and monitoring of lupus nephritis. *Lupus* 2005, 14, 1, 25–30.

16. Balow J.E., Austin H.A.: Maintenance therapy for lupus nephritis – something old, something new. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 10, 1044–1046.
17. Bansal V.K., Beto J.A.: Treatment of lupus nephritis: a meta-analysis of clinical trials. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, 29, 2, 193–199.
18. Bao H., Liu Z.H., Xie H.L., Hu W.X., Zhang H.T., Li L.S.: Successful treatment of class V+IV lupus nephritis with multitarget therapy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 19, 10, 2001–2010.
19. Bargman J.M.: How did cyclophosphamide become the drug of choice for lupus nephritis? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24, 381–384.
20. Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V.: Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2007, 3, 5, 262–272.
21. Behrend M.: Mycophenolate mofetil (Cellcept). *Exp. Opin. Invest. Drugs* 1998, 7, 9, 1509–1519.
22. Berden J.H.M.: Lupus nephritis. *Kidney Int.* 1997, 52, 538–558.
23. Bermas B.L., Hill J.A.: Effects of immunosuppressive drugs during pregnancy. *Arthritis Rheum.* 1995, 38, 12, 1722–1732.
24. Bertias G., Boumpas D.T.: Update on the management of lupus nephritis: let the treatment fit the patient. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2008, 4, 9, 464–472.
25. Bihl G.R., Petri M., Fine D.M.: Kidney biopsy in lupus nephritis: look before you leap. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 1749–1752.
26. Blumenfeld Z., Shapiro D., Steinberg M., Avivi I., Nahir M.: Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. *Lupus* 2000, 9, 401–405.
27. Boletis J.N., Marinaki S., Skalioti C., Lionaki S.S., Iniotaki A., Sfikakis P.P.: Rituximab and mycophenolate mofetil for relapsing lupus nephritis: a long-term prospective study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24, 2157–2160.
28. Bono L., Cameron J.S., Hicks J.A.: The very long-term prognosis and complications of lupus nephritis and its treatment. *Q. J. Med.* 1999, 92, 211–218.
29. Bootsma H., Spronk P., de Boer G., Limburg P., Kallenberg C., Derksen R., Wolters-Dicke J., Gmeling-Meyling F., Kater L., Hermans J.: Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1995, 345, 1595–1599.
30. Boumpas D.T., Austin H.A., Vaughn E.M., Klippel J.H., Steinberg A.D., Yarboro C.H., Balow J.E.: Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. *Lancet* 1992, 340, 8822, 741–745.
31. Boumpas D.T., Austin H.A., Vaughn E.M., Yarboro C.H., Klippel J.H., Balow J.E.: Risk for sustained amenorrhea in patients with systemic lupus erythematosus receiving intermittent pulse cyclophosphamide therapy. *Ann. Intern. Med.* 1993, 119, 366–369.

32. Boumpas D.T., Balow J.E.: Outcome criteria for lupus nephritis trials: a critical overview. *Lupus* 1998, 7, 622–629.
33. Brenner H.I., Feldman B.M., Bombardier C., Silverman E.D.: Sensivity of the systemic lupus erythematosus disease activity index, british isles lupus assessment group index, and systemic lupus activity measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999, 42, 7, 1354–1360.
34. Briggs W.A., Choi M.J., Scheel P.J.: Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31, 213–217.
35. van Bruggen M.C.J., Walgreen B., Rijke T.P.M., Berden J.H.M.: Attenuation of murine lupus nephritis by mycophenolate mofetil. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998, 9, 1407–1415.
36. Bułło B., Rutkowski B.: Mykofenolan mofetilu w leczeniu nefropatii toczniowej – doświadczenia jednego ośrodka. *Nefrol. Nadciśnienie Tętnicze* 2007, 6, 15–22.
37. Bułło B., Zdrojewski Z., Rutkowski B.: Leczenie mykofenolanem mofetilu pacjentów z pierwotnymi kłębuszkowymi zapaleniami nerek – obserwacje własne. *Nefrol. Dial. Pol.* 2002, 6, 220–224.
38. Bułło B., Zdrojewski Z., Rutkowski B.: Mycophenolate mofetil therapeutic approach in patients with chronic glomerulonephritis. *Kidney Int. (Letter)* 2003, 64, 113.
39. Cameron S.J.: Lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10, 413–424.
40. Cameron S.J.: Systemic lupus erythematosus. W: Neilson E.G., Couser W.G. (red.): *Immunologic renal diseases*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, s. 1055–1098.
41. Cameron S.J.: What is the role of long-term cytotoxic agents in the treatment of lupus nephritis? *J. Nephrol.* 1993, 6, 172–176.
42. Camous L., Melander C., Vallet M., Squalli T., Knebelmann B., Noel L.H., Fakhouri F.: Complete remission of lupus nephritis with rituximab and steroids for induction and rituximab alone for maintenance therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 2008, 52, 2, 346–352.
43. Chan T.M.: Mycophenolate mofetil in the treatment of lupus nephritis – 7 years on. *Lupus* 2008, 17, 617–621.
44. Chan T.M., Li F.K., Hao W.K., Chan K.W., Lui S.L., Tang S., Lai K.N.: Treatment of membranous lupus nephritis with nephrotic syndrome by sequential immunosuppression. *Lupus* 1999, 8, 545–551.
45. Chan T.M., Li F.K., Tang C.S., Wong R.W.S., Fang G.X., Ji Y.L., Lau C.S., Wong A.K.M., Tong M.K.L., Chan K.W., Lai K.N.: Efficacy of mycophenolate mofetil In patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *N. Engl. J. Med.* 2000, 343, 16, 1156–1162.
46. Chan T.M., Tse K.C., Tang C.S., Mok M.Y., Li F.K., for the Hong Kong Nephrology Study Group.: Long-term study of mycophenolate mofetil as

- continuous induction and maintenance treatment for diffuse proliferative lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, 16, 1076–1084.
47. Cheema G.S., Roschke V., Hilbert D.M., Stohl W.: Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 6, 1313–1319.
 48. Choi M.J., Eustace J.A., Gimenez L.F., Atta M.G., Scheel P.J., Sothinathan R., Briggs W.: Mycophenolate mofetil treatment for primary glomerular diseases. *Kidney Int.* 2002, 61, 1098–1114.
 49. Contreras G., Pardo V., Leclercq B., Lenz O., Toman E., O’Nan P., Roth D.: Sequential therapies for proliferative lupus nephritis. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 10, 971–980.
 50. Contreras G., Tozman E., Nahar N., Metz D.: Maintenance therapies for proliferative lupus nephritis: mycophenolate mofetil, azathioprine and intravenous cyclophosphamide. *Lupus* 2005, 14 Suppl., 33–38.
 51. Corna D., Morigi M., Facchinetti D., Bertani T., Zoja C., Remuzzi G.: Mycophenolate mofetil limits renal damage and prolongs life in murine lupus autoimmune disease. *Kidney Int.* 1997, 51, 1583–1589.
 52. Cortes-Hernandez J., Ordi-Ros J., Labrador M., Segarra A., Tovar J.L., Balada E., Vilardell-Tarres M.: Predictors of poor renal outcome in patients with lupus nephritis treated with combined pulses of cyclophosphamide and methylprednisolone. *Lupus* 2003, 12, 287–296.
 53. Cramer C.H., Mills M., Valentini R.P., Smoter W.E., Haftel H., Brophy P.D.: Clinical presentation and outcome in a cohort of paediatric patients with membranous lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 3495–3500.
 54. Cross J., Jayne D.: Mycophenolate mofetil in lupus nephritis. *Lupus* 2000, 9, 647–650.
 55. Czekalski S.: Leki pierwszego rzutu w nefropatii toczniowej: które, jak, jak długo? *Nefrol. Dial. Pol.* 2008, 12, 203–205.
 56. Daikh D.I., Wofsy D.: Cutting Edge. Reversal of murine lupus nephritis with CTLA4Ig and cyclophosphamide. *J. Immunol.* 2001, 166, 2913–2916.
 57. Davidson A., Aranow C.: Pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2006, 18, 5, 468–475.
 58. D’Cruz D.P., Houssiau F.A.: The euro-lupus nephritis trial: the development of the sequential treatment protocol. *Lupus* 2009, 18, 10, 875–877.
 59. Dinant H.J., Decker J.L., Klippel J.H., Balow J.E., Plotz P.H., Steinberg A.D.: Alternative modes of cyclophosphamide and azathioprine therapy in lupus nephritis. *Ann. Intern. Med.* 1982, 96, 728–736.
 60. Ding C., Forte S., Jones G.: B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus: an update. *BioDrugs* 2008, 22, 4, 239–249.
 61. Ding C., Jones G.: Anti-interleukin-6 receptor antibody treatment in inflammatory autoimmune diseases. *Rev. Recent Clin. Trials* 2006, 1, 3, 193–200.

62. Donadio J.V., Glasscock R.J.: Immunosuppressive drug therapy in lupus nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 1993, 21, 239–250.
63. Dooley M.A., Falk R.J.: Immunosuppressive therapy of lupus nephritis. *Lupus* 1998, 7, 630–634.
64. Dooley M.A., Hogan S., Jennette C., Falk R. (for the Glomerular Disease Collaborative Network): Cyclophosphamide therapy for lupus nephritis: Poor renal survival in black Americans. *Kidney Int.* 1997, 51, 1188–1195.
65. Dorner T., Kaufmann J., Wegner W.A., Teoh N., Woldenberg D.M., Burmester G.R.: Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) for immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2008, 8, 3, 108.
66. Esdaile J.M., Abrahamowicz M., MacKenzie T., Hayslett J.P., Kashgarian M.: The time-dependence of long-term prediction in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 1994, 37, 3, 359–368.
67. Felson D.T., Anderson J.: Evidence for the superiority of immunosuppressive drugs and prednisone over prednisone alone in lupus nephritis. *N. Engl. J. Med.* 1984, 311, 1528–1533.
68. Feutren G., Milhatsch M.J.: Risk factors for cyclosporine-induced nephropathy in patients with autoimmune diseases. *International Kidney Biopsy Registry of Cyclosporine in Autoimmune Diseases. N. Engl. J. Med.* 1992, 326, 1654–1660.
69. Flanc R.S., Roberts M.A., Strippoli G.F.M., Chadban S.J., Kerr P.G., Atkins R.C. Treatment of diffuse proliferative lupus nephritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Kidney Dis.* 2004, 43, 2, 197–208.
70. Fraenkel L., Bogardus S., Concato J.: Patient preferences for treatment of lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2002, 4, 4, 421–428.
71. Fulton B., Markham A.: Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996, 51, 2, 278–298.
72. Ginzler E.M., Aranow C.: Mycophenolate mofetil in lupus nephritis. *Lupus* 2005, 14, 59–64.
73. Ginzler E.M., Dooley M.A., Aranow C., Kim M.Y., Buyon J., Merrill J.T., Petri M., Gilkeson G.S., Wallace D.J., Weisman M.H., Appel G.B.: Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353, 2219–2228.
74. Glasscock R.J.: Multitarget therapy of lupus nephritis: base hit or home run? *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, 19, 1842–1844.
75. Glicklich D., Acharya A.: Mycophenolate mofetil therapy for lupus nephritis refractory to intravenous cyclophosphamide. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 32, 318–322.
76. Gordon C., Jayne D., Pusey C., Adu D., Amoura Z., Aringer M., Ballerin J., Cervera R., Calvo-Alen J., Chizzolini C., Dayer J.M., Doria A., Ferrario F.,

- Floege J., Guillevin L., Haubitz M., Hiepe F., Houssiau F., Lesavre P., Lightstone L., Meroni P.L., Meyer O., Moulin B., O'Reilly K., Praga M., Schulze-Koops H., Sinico R.A., Smith K.G.C., Tincani A., Vasconcelos C., Hughes G.: European consensus statement on the terminology used in the management of lupus glomerulonephritis. *Lupus* 2009, 18, 257–263.
77. Gourley M.F., Austin H.A., Scott D., Yarboro C.H., Vaughan E.M., Muir J., Boumpas D.T., Klippel J.H., Balow J.E., Steinberg A.: Methylprednisolone and cyclophosphamide, alone or in combination, in patients with lupus nephritis. *Ann. Intern. Med.* 1996, 125, 7, 549–557.
78. Grande J.P., Balow J.E.: Renal biopsy in lupus nephritis. *Lupus* 1998, 7, 611–617.
79. Grootsholten C., Bajema I.M., Florquin S., Steenbergen E.J., Peutz-Kootstra C.J., Goldschmeding R., Bijl M., Hagen E.C., van Houwelingen H.C., Derksen R.H., Berden J.H., Dutch Working Party on Systemic Lupus Erythematosus: Treatment with cyclophosphamide delays the progression of chronic lesions more effectively than does treatment with azathioprine plus methylprednisolone in patients with proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2007, 56, 3, 924–937.
80. Grootsholten C., Berden J.H.M.: Discontinuation of immunosuppression in proliferative lupus nephritis: is it possible? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 1465–1469.
81. Grootsholten C., Ligtenberg G., Hagen E.C., van den Wall Bake A.W.L., de Glas-Vos J.W., Bijl M., Assmann K.J., Bruijn J.A., Weening J.J., van Houwelingen H.C., Derksen R.H.W., Berden J.H.M. for the Dutch working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Azathioprine/methylprednisolone versus cyclophosphamide in proliferative lupus nephritis. A randomized controlled trial. *Kidney Int.* 2006, 70, 732–742.
82. Gross J.A., Dillon S.R., Mudri S., Johnston J., Littau A., Roque R., Rixon M., Schou O., Foley K.P., Haugen H., McMillen S., Waggie K., Schreckhise R.W., Shoemaker K., Vu T., Moore M., Grossman A., Clegg C.H.: TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease: impaired B cell maturation in mice lacking BLYS. *Immunity* 2001, 15, 289–302.
83. Hallegua D., Wallace D.J., Metzger A.L., Rinaldi R.Z., Klinenberg J.R. Cyclosporine for lupus membranous nephritis: experience with ten patients and review of the literature. *Lupus* 2000, 9, 241–251.
84. Haubitz M.: Exploring new territory: the move towards individualised treatment. *Lupus* 2007, 16, 3, 227–231.
85. Hili G.S., Delahousse M., Nochy D., Mandet C., Bariety J.: Proteinuria and tubulointerstitial lesions in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2001, 60, 1893–1903.
86. Houssiau F.A.: Cyclophosphamide in lupus nephritis. *Lupus* 2005, 14, 53–58.
87. Houssiau F.A.: Management of lupus nephritis: an update. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15, 2694–2704.

88. Houssiau F.A.: Thirty years of cyclophosphamide: assessing the evidence. *Lupus* 2007, 16, 212–216.
89. Houssiau F.A., Jadoul M.: Cytotoxic therapy of lupus nephritis: recent developments. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 955–957.
90. Houssiau F.A., Vasconcelos C., D’Cruz D., Sebastiani G.D., Garrido E.R., Danieli M.G., Abramowicz D., Blockmans D., Mathieu A., Direskeneli H., Galeazzi M., Gul A., Levy Y., Petera P., Popovic R., Petrovic R., Sinico R.A., Cattaneo R., Font J., Depresseux G., Cosyns J.P., Cervera R.: Early response to immunosuppressive therapy predicts good renal outcome in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 12, 3934–3940.
91. Houssiau F.A., Vasconcelos C., D’Cruz D., Sebastiani G.D., Garrido E.R., Danieli M.G., Abramowicz D., Blockmans D., Mathieu A., Direskeneli H., Galeazzi M., Gul A., Levy Y., Petera P., Popovic R., Petrovic R., Sinico R.A., Cattaneo R., Font J., Depresseux G., Cosyns J.P., Cervera R.: Immunosuppressive therapy in lupus nephritis. The Euro-Lupus Nephritis Trial, a Randomized Trial of Low-Dose Versus High-Dose Intravenous Cyclophosphamide. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, 8, 2121–2131.
92. Hughes G.: Rituximab in lupus and beyond: the state of the art. *Lupus* 2009, 18, 639–644.
93. Illei G.G., Austin H.A., Crane M., Collins L., Gourley M.F., Yarboro C.H., Vaughan E.M., Kuroiwa T., Danning C.L., Steinberg A.D., Klippel J.H., Balow J.E., Boumpas D.T.: Combination therapy with pulse cyclophosphamide plus pulse methylprednisolone improves long-term renal outcome without adding toxicity in patients with lupus nephritis. *Ann. Intern. Med.* 2001, 135, 4, 248–257.
94. Isenberg D.A.: Treating patients with lupus B-cell depletion. *Lupus* 2008, 17, 5, 400–404.
95. Jacobi A.M., Goldenberg D.M., Hiepe F., Radbruch A., Burmester G.R., Dorner T.: Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann Rheum. Dis.* 2008, 67, 4, 450–457.
96. Jadoul M.: Optimal care of lupus nephritis patients. *Lupus* 2005, 14, 72–76.
97. Kallenberg C.G.M.: Anti-C1q autoantibodies. *Autoimmun. Rev.* 2008, 7, 612–615.
98. Karim Y., D’Cruz D.P.: The NIH pulse cyclophosphamide regime: the end of an era? *Lupus* 2004, 13, 1–3.
99. Klinger M.: Toczeń rumieniowaty układowy z zajęciem nerek; postępy w badaniach nad patogenezą, diagnostyką i terapią. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1997, 97, 3, 287–293.
100. Klinger M., Bernat B.: Patofizjologia białkomoczu i krwinkomoczu. W: Rutkowski B., Klinger M. (red.): *Kłębuszkowe choroby nerek*, Gdańsk: Wydawnictwo Medyczne MAKmed, 2003, s. 133–140.

101. Klinger M., Magott-Procelewska M.: Toczniove zapalenie nerek. W: Rutkowski B., Klinger M. (red.): Kłębuszkowe choroby nerek, Gdańsk: Wydawnictwo Medyczne MAKmed, 2003, s. 281–291.
102. Klinger M., Oko A., Mazanowska O., Bułło B.: Rozpoznawanie i leczenie nefropatii w przebiegu chorób układowych. W: Rutkowski B., Czekalski S. (red.): Rozpoznawanie i leczenie chorób nerek – wytyczne, zalecenia i standardy postępowania. Poznań: Termedia Wydawnictwo Medyczne, 2008, s. 82–93.
103. Klinger M., Rychlewska B., Czyż W.: Comiesięczne dożylnie wlewy cyklofosfamid w leczeniu toczniowego zapalenia nerek. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1994, 92, Spec No, 70–77.
104. Kowalewska J., Smith K.D., Alpers C.E: Recent advances in glomerulonephritis. *Current Diagnostic Pathology*, 2007, 13, 32–42.
105. Laboratorium Immunologii Klinicznej Akademickie Centrum Medycyny Laboratoryjnej ACK Szpital Akademii Medycznej w Gdańsku: Informator badań laboratoryjnych. Gdańsk, 2007, s. 10–34.
106. Leaker B., Fairley K.F., Dowling J., Kincaid-Smith P.: Lupus nephritis: clinical and pathological correlation. *Q. J. Med.* 1987, 62, 238, 163–179.
107. Lindholm C., Borjesson-Asp K., Zedjanchi K., Sundqvist A.C., Tarkowski A., Bokarewa M.: Longterm clinical and immunological effects of anti-CD20 treatment in patients with refractory systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2008, 35, 5, 826–833.
108. Linnik M.D., Hu J.Z., Heilbrunn K.R., Strand V., Hurley F.L., Joh T.: Relationship between anti-double-stranded DNA antibodies and exacerbation of renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, 4, 1129–1137.
109. Linsley P.S., Greene J.L., Brady W., Bajorath J., Ledbetter J.A., Peach R.: Human B7 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA4 receptors. *Immunity* 1994, 1, 793–801.
110. Lloyd W., Schur P.H.: Immune complexes, complement and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*, 1981, 60, 3, 208–217.
111. Lu F., Tu Y., Peng X., Wang L., Wang H., Sun Z., Zheng H., Hu Z.: A prospective multicentre study of mycophenolate mofetil combined with prednisolone as induction therapy in 213 patients with active lupus nephritis. *Lupus* 2008, 17, 622–629.
112. Lu T.Y., Ng K.P., Cambridge G., Leandro M.J., Edwards J.C., Ehrenstein M., Isenberg D.A.: A retrospective seven-year analysis of the use of B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus at University College London hospital: the first fifty patients. *Arthritis Rheum.* 2009, 15, 61, 482–487.
113. Majdan M.: Leczenie nerkozastępcze w wybranych chorobach tkanki łącznej. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2006, 115, 4, 426–431.

114. Majdan M.: Zmiany w nerkach w przebiegu schorzeń autoimmunizacyjnych. W: Książek A., Rutkowski B. (red.): *Nefrologia*. Lublin: Wydawnictwo Czelej, 2004, s. 391–409.
115. Manzi S., Rairie J.E., Carpenter B.A., Kelly R.H., Jagarlapudi S.P., Seireika S.M., Medsger T.A., Ramsey-Goldman R.: Sensitivity and specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. *Arthritis Rheum.* 1996, 39, 7, 1178–1188.
116. Martins L., Rocha G., Rodrigues A., Santos J., Vasconcelos C., Correia J., Farinha F., Almeida I., Barbosa P., Guimaraes S.: Lupus nephritis: a retrospective review of 78 cases from a single center. *Clin. Nephrol.* 2002, 57, 2, 114–119.
117. McKinley A., Park E., Spetie D., Hackshaw K.V., Nagaraja S., Hebert L.A., Rovin B.H.: Oral cyclophosphamide for lupus glomerulonephritis: an underused therapeutic option. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 4, 1754–1760.
118. Melander C., Sallee M., Trolliet P., Canzon S., Belefant X., Daugas E., Remy P., Zarrouk V., Pillebout E., Jacquot C., Biffa J.J., Karras A., Masse V., Lesavre P., Elie C., Brocheriou I., Knebelmann B., Noel L.H., Fakhouri F.: Rituximab in severe lupus nephritis: early B-cell depletion affects long-term renal outcome. *Clin. Am. J. Soc. Nephrol.* 2009, 4,3, 579–587.
119. Mittal B.V., Rennke H.G., Singh A.K.: The role of kidney biopsy in the management of lupus nephritis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 2005, 14, 1–8.
120. Mojcik C.F., Klippel J.H.: End-stage renal disease and systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 1996, 101, 100–107.
121. Mok C.C.: Cyclophosphamide for severe lupus nephritis: Where are we now? *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 12, 3748–3750.
122. Mok C.C., Lai K.N.: Mycophenolate mofetil in lupus glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 2002, 40, 3, 447–457.
123. Mok C.C., Ying K.Y., Ng W.L., Lee K.W., To C.H., Lau C.S., Wong R.W.: Long-term outcome of diffuse proliferative lupus glomerulonephritis treated with cyclophosphamide. *Am. J. Med.* 2006, 119, 355, 25–33.
124. Moore P.A., Belvedere O., Orr A., Pieri K., LaFleur D.W., Feng P., Soppet D., Charters M., Gentz R., Parmelee D., Li Y., Galperina O., Giri J., Roschke V., Nardelli B., Carrell J., Sosnovtseva S., Greenfield W., Ruben S.M., Olsen H.S., Fikes J., Hilbert D.M.: BLyS: Member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 1999, 285, 260–263.
125. Moroni G., Doria A., Mosca M., Alberighi O.D., Ferraccioli G., Todesco S., Manno C., Altieri P., Ferrara R., Greco S., Ponticelli C.: A randomized pilot trial comparing cyclosporine and azathioprine for maintenance therapy in diffuse lupus nephritis over four years. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 1, 5, 925–932.
126. Moroni G., Doria A., Ponticelli: Cyclosporine (CsA) in lupus nephritis: assessing the evidence. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24, 1, 15–20.

127. Moroni G., Gallelli B., Quaglini S., Banfi G., Rivolta E., Messa P., Ponticelli C.: Withdrawal of therapy in patients with proliferative lupus nephritis: long-term follow-up. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 1541–1548.
128. Moroni G., Pasquali S., Quaglini S., Banfi G., Casanova S., Maccario M., Zucchelli P., Ponticelli C.: Clinical and prognostic value of serial renal biopsies in lupus nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 1999, 34, 3, 530–539.
129. Moroni G., Quaglini S., Gallelli B., Banfi G., Messa P., Ponticelli C.: The long-term outcome of 93 patients with proliferative lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 2531–2539.
130. Mortensen E.S., Rekvig O.P.: Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against nucleosomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 696–704.
131. Najafi C.C., Korbet S.M., Lewis E.J., Schwartz M.M., Reichlin M., Evans J.: Significance of histologic patterns of glomerular injury upon long-term prognosis in severe lupus glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2001, 59, 2156–2163.
132. Navaneethan S.D., Viswanathan G., Strippoli G.F.: Treatment options for proliferative lupus nephritis: an update clinical trial evidence. *Drugs* 2008, 68, 15, 2095–2104.
133. Nossent H., Berden J., Swaak T.: Renal immunofluorescence and the prediction of renal outcome in patients with proliferative lupus nephritis. *Lupus* 2000, 9, 504–510.
134. Nossent J.C., Henzen-Logmans S.C., Vroom T.M., Huysen V., Berden J.H., Swaak A.J.: Relation between serological data at the time of biopsy and renal histology in lupus nephritis. *Rheumatol. Int.* 1991, 11, 2, 77–82.
135. Orzechowska-Juzwenko K.: Leki przeciwnowotworowe. W: Kostowski W., Herman Z.S. (red.): *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii.* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2003.
136. Petri M.: Cyclophosphamide: new approaches for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004, 366–371.
137. Petri M., Kasitanon N., Lee S.S., Link K., Magder L., Bae S.C., Hanly J.G., Isenberg D.A., Nived O., Sturfelt G., van Vollenhoven R., Wallace D.J., Alarcon G.S., Adu D., Avila-Casado C., Bernatsky S.R., Bruce I.N., Clarke A.E., Contreras G., Fine D.M., Gladman D.D., Gordon C., Kalunian K.C., Madaio M.P., Rovin B.H., Sanchez-Guerrero J., Steinsson K., Aranow C., Balow J.E., Buyon J.P., Ginzler E.M., Khamashta M.A., Urowitz M.B., Dooley M.A., Merrill J.T., Ramsey-Goldman R., Font J., Tumlin J., Stoll T., Zoma A., for Systemic Lupus International Collaborating Clinics: Systemic Lupus International Collaborating Clinics Renal Activity/Response Exercise. *Arthritis Rheum.* 2008, 58, 6, 1784–1788.
138. Ponticelli C., Moroni G.: Flares in lupus nephritis: incidence, impact on renal survival and management. *Lupus* 1998, 7, 635–638.
139. Ponticelli C., Moroni G.: Renal biopsy in lupus nephritis – what for, when and how often? *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 2452–2454.

140. Ramsey-Goldman R., Mientus J.M., Kutzer J.E., Mulvihill J.J., Medsger T.A.: Pregnancy outcome in women with systemic lupus erythematosus treated with immunosuppressive drugs. *J. Rheumatol.* 1993, 20, 1152–1156.
141. Remans P.H.J, Wijbrandts C.A., Sanders M.E., Toes R.E., Breedveld F.C., Tak P.P., van Laar J.M., Reedquist K.A.: CTLA4-Ig suppresses reactive oxygen species by preventing synovial adherent cell-induced inactivation of Rap1, a Ras Family GTPase mediator of oxidative stress in rheumatoid arthritis T cells. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, 3135–3143.
142. Renal Disease Subcommittee of the American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Criteria: The American College of Rheumatology Response Criteria for Proliferative and Membranous Renal Disease in Systemic Lupus Erythematosus Clinical Trials. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, 2, 421–432.
143. Reveille J.D.: Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13, 290–297
144. Reynolds J.A., Toescu V., Mee C.S., Prabu A., Situnayake D., Gordon C.: Effects of rituximab on resistant SLE disease including lung involvement. *Lupus* 2009, 18, 1, 67–73.
145. Robak E., Robak T.: Monoclonal antibodies therapy in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr. Drug Targets.* 2009, 10, 1, 26–37.
146. Sabahi R., Anolik J.H.: B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus. *Drugs* 2006, 66, 15, 1933–1948.
147. Sahin G.M., Sahin S., Kiziltas S., Masatlioglu S., Oguz F., Ergin H.: Mycophenolate mofetil versus azathioprine in maintenance therapy of lupus nephritis. *Ren. Fail.* 2008, 30, 865–869.
148. Schiffer L., Sinha J., Huang W., von Gonsdorff G., Schiffer M., Madaio M.P., Davidson A.: Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition. *J. Immunol.* 2003, 171, 489–497.
149. Schneider M.: Exploring new territory: considering the future. *Lupus* 2007, 16, 3, 221–226.
150. Schwartz M.M., Korbet S.M., Katz R.S., Lewis E.J.: Evidence of concurrent immunopathological mechanisms determining the pathology of severe lupus nephritis. *Lupus* 2009, 18, 149–158.
151. Schwartz M.M., Korbet S.M., Lewis E.J. (for the Collaborative Study Group): The prognosis and pathogenesis of severe lupus glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 23, 1298–1306.
152. Segarra A., Amoedo M.L., Garcia J.M.M, Pons S., Praga M., Garcia E.I., Alonso J.C., Gasco J.M., Pou J., Piera L.: Efficacy and safety of “rescue therapy” with mycophenolate mofetil in resistant primary glomerulonephritis – a multicenter study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 1351–1360.

153. Sesso R., Monteiro M., Sato E., Kisztajn G., Silva L., Ajzen H.: A controlled trial of pulse cyclophosphamide versus pulse methylprednisolone in severe lupus nephritis. *Lupus* 1994, 3, 107–112.
154. Sinclair A., Appel G., Dooley M.A., Ginzler E., Isenberg D., Jayne D., Wofsy D., Solomons N.: Mycophenolate mofetil as induction and maintenance therapy for lupus nephritis: rationale and protocol for the randomized, controlled Aspreva Lupus Management Study (ALMS), *Lupus* 2007, 16, 12, 972–980.
155. Sinico R.A., Bollini B., Sabadini E., Di Toma L., Radice A.: The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J. Nephrol.* 2002, 15, Suppl 6, 20–27.
156. Stassen P.M., Kallenberg C.G.M., Stegman C.A.: Use of mycophenolic acid in non-transplant renal diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 1013–119.
157. Steinberg A.D., Steinberg S.C.: Long-term preservation of renal function in patients with lupus nephritis receiving treatment that includes cyclophosphamide versus those treated with prednisolone alone. *Arthritis Rheum.* 1991, 34, 945–950.
158. Stohl W., Looney R.J.: B cell depletion therapy in systemic rheumatic diseases: different strokes for different folks? *Clin. Immunol.* 2006, 121, 1–12.
159. Sutter J.A., Kwan-Morley J., Durham J., Du Y.Z., Kamoun M., Albert D., Eisenberg R.A., Luning Prak E.T.: A longitudinal analysis of SLE patients treated with rituximab (anti-CD20): factors associated with B lymphocyte recovery. *Clin Immunol.* 2008, 126, 3, 282–290.
160. Sysa-Jędrzejowska A.: Toczeń układowy. W: Kowalski M.L.(red.): *Immunologia kliniczna*. Łódź: Mediton Oficyna Wydawnicza, 2000, s. 341–348.
161. Tahir H., Isenberg D.A.: Novel therapies in lupus nephritis. *Lupus* 2005, 14, 77–82.
162. Tam L.S., Li E.K., Leung C.B., Wong K.C., Lai F.M.M., Wang A., Szeto C.C., Lui S.F.: Long-term treatment of lupus nephritis with cyclosporine A. *Q. J. Med.* 1998, 91, 573–580.
163. Tan S.M., Xu D., Rosche V., Perry J.W., Arkfeld D.G., Ehresmann G.R., Migone T.S., Hillbert D.M., Stohl W.: Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003, 48, 4, 982–992.
164. Ter Borg E.J., Horst G., Hummel E.J., Limburg P.C., Kallenberg C.G.M.: Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1990, 33, 5, 634–643.
165. Waldman M., Appel G.B.: Update on the treatment of lupus nephritis. *Kidney Int.* 2006, 70, 1403–1412.
166. Walsh M., James M., Jayne D., Tonelli M., Manns B.J., Hemmelgarn B.R.: Mycophenolate mofetil for induction therapy of lupus nephritis: a systemic review and meta-analysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 2, 968–975.

167. Weening J.J., D'Agati V.D., Schwartz M.M., Seshan S.V., Alpers C.E., Appel G.B., Balow J.E., Bruijn J.A., Cook T., Ferrario F., Fogo A.B., Ginzler E.M., Herbert L., Hill G., Hill P., Jennette J.C., Kong N.C., Lesavre P., Lockshin M., Looi L.M., Makino H., Moura L.A., Nagata M., on behalf of the International Society of Nephrology and Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus Nephritis: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revised. *Kidney Int.* 2004, 65, 521–530.
168. Westgeest A.A., van den Brink H.G., de Jong J., Swaak A.J., Smeenk R.J.: Antinuclear antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: a comparison of counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting. *Rheumatology Int.* 1987, 7, 2, 77–82.
169. Yu F., Tan Y., Liu G., Wang S., Zou W., Zhao M.: Clinicopathological characteristics and outcomes of patients with crescentic lupus nephritis. *Kidney Int.* 2009, 76, 307–317.
170. Yu F., Tan Y., Wu L.H., Zhu S.N., Liu G., Zhao M.H.: Class IV-G and IV-S lupus nephritis in Chinese patients: a large cohort study from a single center. *Lupus* 2009, 18, 1073–1081.
171. Ząbek J. Metody wykrywania autoprzeciwciał „markerowych” w chorobach z autoimmunizacją. W: Kowalski M.L. (red.): *Immunologia kliniczna*. Łódź: Mediton Oficyna Wydawnicza, 2000, s. 765–805.
172. Zhu B., Chen N., Lin Y., Ren H., Zhang W., Wang W., Pan X., Yu H.: Mycophenolate mofetil in induction and maintenance therapy of severe lupus nephritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22, 1933–1942.
173. Zimmermann-Górska I.: Immunodiagnostyka chorób reumatycznych (tkanki łącznej). W: Żeromski J.(red.): *Immunopatologia kliniczna*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2000, s. 17–35.

8. STRESZCZENIE

Nefropatia toczniowa należy do częstych powikłań toczenia rumieniowatego układowego (SLE). W momencie rozpoznania choroby układowej obserwuje się nefropatię już u około 50% chorych. To przekłada się na zalecenia *American College of Rheumatology*, które mówią, że stanowi ona jedno z głównych kryteriów rozpoznania SLE. W leczeniu nefropatii toczniowej stosowanych jest kilka leków immunosupresyjnych. Najbardziej znanym i jednocześnie najczęściej stosowanym schematem leczenia jest podawanie cyklofosfamid (CYC) w postaci pulsów dożylnych, łącznie ze steroidami. Schemat leczenia z CYC jest z dobrym efektem klinicznym stosowany w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego od około 20 lat. Istnieje jednak grupa chorych z nefropatią toczniową, która nie reaguje pozytywnie na to leczenie. W związku z tym, celem podjętych badań było poszukiwanie laboratoryjnych wskaźników, pozwalających przewidzieć skuteczność leczenia CYC chorych z nefropatią toczniową. Szczegółowo cele obejmowały: 1) Ustalenie wskaźników prognostycznych przydatnych w ocenie efektywności leczenia CYC u pacjentów z nefropatią toczniową; 2) Określenie przydatności wybranych wskaźników do oceny przebiegu leczenia oraz szans uzyskania remisji choroby oraz 3) Ocenę efektu leczenia CYC u badanych chorych w perspektywie rocznej obserwacji.

Materiał kliniczny stanowiła grupach 67 chorych z rozpoznąną nefropatią toczniową, potwierdzoną badaniem biopsyjnym nerki u większości badanych. Wszyscy chorzy byli leczeni w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie od 1993 roku do 2008 roku. W badanej grupie było 56 kobiet i 11 mężczyzn, w wieku od 18 lat do 71 lat, średni wiek wynosił $35,8 \pm 13,4$ lat. U wszystkich badanych rozpoznano tocznię rumieniowatą układową, opierając się na kryteriach ACR. Badani pacjenci otrzymywali leczenie w postaci dożylnych pulsów CYC, zgodnie z obowiązującym schematem leczenia.

Pierwsza faza leczenia (zasadnicza) polegała na podawaniu pulsów dożylnych CYC jeden raz w miesiącu w okresie sześciu miesięcy u wszystkich badanych. Druga faza leczenia - rodzaj leczenia podtrzymującego, polegała na: podawaniu CYC co trzy miesiące albo konwersji do azatiopryny, cyklosporyny czy mykofenolanu mofetilu. W przypadku braku pozytywnej reakcji na leczenie CYC w czasie pierwszych sześciu miesięcy, kontynuowano podawanie CYC parenteralnie albo konwertowano chorych do leczenia mykofenolanem mofetilu.

W celu oceny efektywności leczenia immunosupresyjnego raz w miesiącu wykonywano następujące badania: badanie morfologiczne krwi, stężenie kreatyniny, dobowe wydalanie białka z moczem oraz ocenę osadu moczu i klirens kreatyniny endogennej. Parametry gospodarki białkowej oznaczano co 3 miesiące. Dodatkowo przed leczeniem, po 6 miesiącach i po roku przyjmowania leku wykonywano oznaczenia stężenia składowych dopełniacza C3 i C4, miano przeciwciał

ANA i stężenia immunoglobulin klasy A, G, M. Wszystkie wymienione powyżej badania wykonywane były w Laboratorium Centralnym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przy użyciu rutynowo stosowanych metod laboratoryjnych.

Leczenie aktywnej nefropatii toczniowej pulsami CYC nie okazało się leczeniem efektywnym u wszystkich pacjentów. Zatem badaną grupę chorych ze względu na efektywność leczenia podzielono na dwie grupy: RE - pacjentów reagujących na leczenie CYC oraz N-RE - pacjentów niereagujących na leczenie CYC. Kryterium podziału na te dwie grupy stanowił spadek białkomoczu w okresie pierwszych 6 miesięcy leczenia. Do grupy RE zakwalifikowano chorych, u których w ciągu 6 miesięcy uzyskano średni spadek białkomoczu dobowego o co najmniej 30 % w stosunku do wartości sprzed leczenia. Z kolei chorzy, u których w okresie leczenia spadek białkomoczu nie przekraczał 30% w stosunku do wartości sprzed leczenia zakwalifikowano do grupy N-RE. Pomiedzy grupą leczonych RE a N-RE nie wykazano istotnych różnic w poszczególnych parametrach, charakteryzujących stan chorych, jak: wiek, masa ciała, czas trwania tocznia rumieniowatego czy choroby nerek, średnie ciśnienie tętnicze czy wielkość białkomoczu dobowego. W okresie sześciu miesięcy leczenia pulsami CYC w grupie pacjentów RE obserwowano ogromny, bo ponad 80% spadek wielkości proteinurii. W grupie pacjentów N-RE wielkość białkomoczu dobowego zmniejszyła się w niewielkim stopniu, średnio około 20% wartości wyjściowych.

Przed rozpoczęciem leczenia CYC stężenie kreatyniny, białka całkowitego, albuminy, cholesterolu czy trójglicerydów w surowicy krwi, jak i wielkość leukocytozy we krwi nie różniły się znamienne statystycznie pomiędzy obu badanymi grupami. Nie obserwowano również istotnych różnic w wielkości klirensu kreatyniny. Zaobserwowano jedynie nieco niższe stężenie hemoglobiny we krwi w grupie pacjentów RE. Spośród badań najwyraźniej uwidoczniła się różnica w wielkości erytrocyturii, która była niemal dwukrotnie wyraźniej mniejsza w grupie pacjentów N-RE. Ponadto u N-RE obserwowano wyraźnie niższe miano przeciwciał ANA oraz niższe stężenie IgG w surowicy. Natomiast stężenie składowej dopełniacza C3 było niższe w grupie pacjentów RE, ale różnica nie była znamienna statystycznie.

W przypadku trzech badań: wielkości erytrocyturii oraz wielkości miana przeciwciał ANA i stężenia składowej C3 dopełniacza w surowicy krwi wyraźnie uwidoczniły się różnice pomiędzy pacjentami RE a N-RE na leczenie CYC. Wielkość erytrocyturii oraz miano ANA należą do badań półilościowych. Aby umożliwić opracowanie uzyskanych wyników i ułatwić ich interpretację, poszczególnym parametrom przypisano liniowo zależne wartości punktowe. Wprowadzono wskaźnik Ecyt, wskaźnik ANA oraz sumę wskaźników ANA+Ecyt. Także połączono w jeden wskaźnik trzy najbardziej odróżniające badania i wprowadzono wskaźnik $[ANA+Ecyt]/C3$. Poddano analizie statystycznej wymienione wskaźniki w obydwu grupach. Okazało się, że wskaźnikami najlepiej odzwierciedlającymi

różnice pomiędzy chorymi N-RE a RE okazała się suma wskaźników ANA+Ecyt oraz każdy z tych wskaźników osobno.

Po trzech miesiącach leczenia CYC obserwowano znaczącą różnicę pomiędzy pacjentami RE i N-RE w wielkości dobowego wydalania białka z moczem. Towarzyszyły temu wyraźnie niższe stężenia białka całkowitego i albuminy w surowicy u chorych N-RE.

Różnice te uwydatniły się jeszcze wyraźniej po sześciu miesiącach leczenia CYC. Ponadto obserwowano różnice znamienne statystycznie, porównując podstawowe parametry gospodarki lipidowej: stężenie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów w surowicy, których poziomy były wyższe u chorych N-RE. Erytrocyturia po sześciu miesiącach terapii CYC okazała się około dwukrotnie wyższa u pacjentów N-RE. Pozostałe badania, takie jak parametry funkcji nerek czy stężenie hemoglobiny we krwi nie różniły się pomiędzy chorymi RE a N-RE. W grupie pacjentów N-RE zaobserwowano jednak niewielki spadek dobowego wydalania białka z moczem w czasie sześciu miesięcy leczenia cyklofosfamidem. W przypadku porównania wielkości proteinurii przed leczeniem i po sześciu miesiącach uzyskano statystycznie znamienne ($p < 0,05$) spadek z $6,4 \pm 3,2$ g na $4,2 \pm 0,5$ g na dobę.

W czasie sześciu miesięcy leczenia CYC obserwowano wyraźny spadek wskaźnika Ecyt w grupie chorych RE, podczas gdy u chorych N-RE wskaźnik Ecyt utrzymywał się na stałym poziomie. Najwyraźniejszy spadek wskaźnika Ecyt u chorych RE występował w okresie pierwszych dwóch miesięcy leczenia, a po czwartym miesiącu wskaźnik ten był niższy w grupie pacjentów RE. Ponadto w grupie chorych RE uzyskano wysoce znamienne statystycznie korelację pomiędzy wskaźnikiem Ecyt a względnym procentowym dobowym wydalaniem białka z moczem ($r=0,97$; $p=0,0004$). W przypadku chorych N-RE zależność ta była słabiej zaznaczona ($r=0,75$; $p < 0,05$).

Po sześciu miesiącach leczenia grupie chorych RE wskaźniki: Ecyt, ANA, ANA+Ecyt oraz $[ANA+Ecyt]/C3$ obniżyły się do poziomów obserwowanych u pacjentów N-RE. We wszystkich przypadkach wskaźniki te po sześciu miesiącach leczenia w grupie pacjentów RE różniły się znamienne statystycznie od wyników uzyskanych na początku leczenia.

W grupie pacjentów N-RE nie obserwowano zmian we wskaźnikach przebiegu choroby przed i po sześciu miesiącach leczenia CYC. Jedynym wskaźnikiem, który uległ wzrostowi do poziomów podobnych w obydwu badanych grupach po sześciu miesiącach leczenia było stężenie składowej C3 dopełniacza w surowicy. Wyniki te potwierdzają, że zaproponowane wskaźniki (Ecyt i ANA) są, obok proteinurii, bardzo przydatnymi miernikami efektywności leczenia cyklofosfamidem.

Kolejnym etapem prowadzonych badań była ocena efektywności leczenia podtrzymującego CYC lub innymi lekami (Inne) i ich wpływu na wskaźniki przebiegu choroby. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy konieczne jest

leczenie podtrzymujące oraz, czy któreś z rodzajów terapii podtrzymującej można uznać za efektywniejsze.

Wyniki podstawowych badań laboratoryjnych, wykonywanych po 9 oraz po 12 miesiącach leczenia CYC lub innymi lekami nie różniły się istotnie od wyników, uzyskanych po sześciu miesiącach leczenia. Obserwowano nadal znaczącą różnicę w wielkości dobowego wydalania białka z moczem pomiędzy pacjentami RE i N-RE. Towarzyszyły temu wyraźnie niższe stężenia białka całkowitego i albuminy w surowicy u chorych N-RE. Dodatkowo u pacjentów N-RE obserwowano wyższą erytrocyturię, około trzykrotnie w porównaniu z pacjentami RE. Pozostałe badania, jak parametry funkcji nerek czy stężenie hemoglobiny i limfocytoza we krwi nie różniły się pomiędzy badanymi grupami chorych. W grupie pacjentów RE, leczonych pulsami CYC (RE-CYC) lub innymi lekami (RE-Inne) w okresie kolejnych sześciu miesięcy leczenia uzyskano dalszy spadek proteinurii i erytrocyturii. Podczas gdy w grupie chorych N-RE, niezależnie od prowadzonego leczenia podtrzymującego, różnic tych nie obserwowano.

Dodatkowym celem badań była ocena wpływu prowadzonego leczenia immunosupresyjnego na parametry funkcji nerek, jak: stężenie kreatyniny w surowicy i klirens endogennej kreatyniny w dwóch grupach chorych. W czasie dwunastu miesięcy leczenia immunosupresyjnego stężenie kreatyniny w surowicy stopniowo malało u chorych RE z $1,41 \pm 0,12$ mg/dl do $1,06 \pm 0,05$ mg/dl, podczas gdy u chorych N-RE po przejściowym spadku w pierwszych miesiącach leczenia, praktycznie nie uległo zmianie. Podobnie zaobserwowano wzrost klirensu kreatyniny u chorych RE w czasie pierwszych sześciu miesięcy leczenia, a następnie utrzymanie się na niezmiennym poziomie. U chorych N-RE klirens kreatyniny endogennej nie zmienił się istotnie w okresie roku leczenia immunosupresyjnego.

Pośrednim celem badań była także ocena wpływu leczenia immunosupresyjnego na podstawowe parametry gospodarki białkowej i lipidowej. W okresie sześciomiesięcznej terapii CYC w grupie pacjentów RE wzrastało stężenie białka całkowitego i albuminy w surowicy. W czasie leczenia podtrzymującego parametry gospodarki białkowej utrzymywały się na stałym poziomie. U pacjentów N-RE stężenie białka całkowitego w surowicy nie zmieniło się istotnie w trakcie leczenia immunosupresyjnego. Natomiast stężenie albuminy w surowicy wykazywało powolną tendencję wzrostową w okresie roku terapii i w tym przypadku uzyskano różnice znamienne statystycznie. Parametry gospodarki białkowej nie wykazywały istotnych różnic w badanych grupach chorych w zależności od prowadzonego leczenia podtrzymującego.

Parametry gospodarki lipidowej nie zmieniły się w sposób tak wyraźny, jak parametry gospodarki białkowej. U pacjentów RE obserwowano statystycznie znamienne niższe stężenie cholesterolu dopiero po 12 miesiącach leczenia, a stężenie trójglicerydów zmniejszyło się statystycznie znamienne już po sześciu miesiącach. W przypadku chorych N-RE parametry gospodarki lipidowej nie uległy zasadniczym zmianom. Stężenie cholesterolu i trójglicerydów w surowicy

nie wykazywało wyraźnych różnic pomiędzy badanymi grupami w zależności od zmian w prowadzonej terapii podtrzymującej.

Podsumowując wyniki przedstawionych badań oraz jednocześnie próbując odpowiedzieć na postawione w celu pracy pytania, można zasugerować, że istnieje grupa chorych, która wykazuje się wysoką wrażliwością na leczenie CYC. Dotyczy to pacjentów z objawami bardzo aktywnej nefropatii i podobnie aktywnej choroby układowej. Pacjenci, którzy pozytywnie reagują na CYC charakteryzują się obecnością wyraźnej erytrocyturii (wynoszącej około 20 erytrocytów w polu widzenia) oraz wysokimi mianami przeciwciał ANA (powyżej 1: 640), a dodatkowym wskaźnikiem są niskie stężenia składowej C3 dopełniacza (około 0,6-0,7g/l). Należy podkreślić, że znacznie bardziej przydatne i wiarygodne zastosowanie, zarówno w odpowiedzi konkretnego pacjenta na leczenie CYC okazały się opracowane na potrzeby tej pracy wskaźniki Ecyt i ANA oraz łączony wskaźnik ANA+Ecyt. Monitorowanie efektywności leczenia CYC nefropatii toczniowej opiera się na ocenie względnego wydalania białka z moczem i erytrocyturii. Erytrocyturia nie tylko jest parametrem aktywności nefropatii, ale również jest parametrem monitorowania leczenia, równorzędnie z białkomoczem. W okresie pierwszych sześciu miesięcy leczenia CYC obserwuje się najbardziej wyraźne zmiany w opisywanych wskaźnikach przebiegu choroby. Leczenie podtrzymujące innymi lekami immunosupresyjnymi jest tak samo efektywne jak podawanie pulsów CYC co 3 miesiące.

Wydaje się, że cyklofosfamid można nadal uważać za leczenie pierwszego rzutu w grupie chorych, charakteryzujących się wysoką aktywnością immunologiczną choroby, a nefropatia toczniowa manifestuje się obecnością klinicznie - białkomoczu i znaczącej erytrocyturii. Natomiast prostym i wiarygodnym, a na dodatek mającym znaczenie prognostyczne miernikiem aktywności immunologicznej w nefropatii toczniowej jest wskaźnik ANA a ważnym klinicznym miernikiem obok zachowania się proteinurii, także wskaźnik Ecyt. Wydaje się, że osoby zaliczane na podstawie opracowanych wskaźników do grupy niereagujących na terapię cyklofosfamidem winny mieć *a priori* podjętą próbę innego niż cyklofosfamid leczenia immunosupresyjnego (mykofenolan mofetilu, terapia biologiczna lub inne).

9. SUMMARY

Lupus nephropathy is one of common complications of systemic lupus erythematosus (SLE). At the time of diagnosis of the systemic disease nephropathy is observed in as much as 50% of the patients. This is reflected in the recommendations of the *American College of Rheumatology (ACR)*, which recognize nephropathy as one of the main diagnostic criteria of SLE. Treatment of lupus nephropathy involves use of several immunosuppressive medications. The most widely known and most frequently employed treatment plan is cyclophosphamide (CYC) given in intravenous bolus injections, combined with corticosteroids. This CYC treatment plan has been used at the Department of Nephrology, Transplantology and Internal Medicine for about 20 years, with good therapeutic effect. However, certain patients with lupus nephritis do not respond well to such treatment. Therefore, the objective of my research was to identify laboratory markers predicting efficiency of CYC-based treatment in patients with lupus nephropathy, and namely to: 1) establish prognostic markers useful in the evaluation of efficiency of CYC-based treatment in patients with lupus nephritis; 2) determine the usefulness of selected parameters in monitoring of the course of therapy and prediction of chances for remission; and 3) assessment of the therapeutic effect of CYC-based treatment in the studied population of patients within a one-year follow-up period.

The clinical material for the research was a population of 67 patients with diagnosed lupus nephritis, confirmed in renal biopsy in most of the subjects. All the patients were treated at the Department of Nephrology, Transplantology and Internal Medicine, Medical University of Gdańsk in the period from 1993 to 2008. The studied group included 56 women and 11 men, aged 18 to 71 years, with mean age of $35,8 \pm 13,4$ years. All the patients were diagnosed with systemic lupus erythematosus, based on the criteria formulated by the ACR. The patients received treatment in the form of intravenous pulse injections of CYC, according to the established treatment plan.

The first (principal) phase of treatment included administration of intravenous pulse injections of CYC once a month for six months in all the patients. The second phase, which was a kind of maintenance treatment, included: administration of CYC every three months or conversion to azathioprine, cyclosporine or mycophenolate mofetil. In cases of absence of positive response to CYC-based treatment over the first six months, parenteral administration of CYC was continued or the patient was switched to treatment with mycophenolate mofetil.

For the evaluation of efficiency of the immunosuppressive therapy the following tests and measurements were performed: blood count, serum creatinine, 24-hour urine protein excretion, urine sediment analysis and endogenous creatinine clearance once a month. Protein metabolism parameters were measured every 3 months. Additionally, levels of C3 and C4 complement proteins, titer of

anti-nuclear antibodies (ANA) and levels of immunoglobulins A, G, and M were taken before treatment, after 6 months of therapy and then after one year. All the tests were done at the Central Laboratory of the University Clinical Centre of the Medical University of Gdańsk, using standard laboratory techniques.

Treatment of active lupus nephritis with pulse injections of CYC did not prove effective in all the patients. Therefore, the studied population was divided into two groups, based on the observed treatment effect: RE – responders to CYC-based treatment and N-RE – non responders to CYC-based treatment. The criterion used for classifying patients into the two groups was reduction of proteinuria within the first 6 months of treatment. Included in the RE group were the patients in whom reduction of proteinuria by at least 30% was obtained over the period of 6 pulse injections of CYC, compared to the baseline level measured before initiation of the treatment. The patients showing reduction of proteinuria not exceeding 30% compared to pre-treatment baseline were classified as N-RE. There were no significant differences between the two groups with respect to demographic and other patient characteristic data, such as: age, body weight, duration of systemic lupus erythematosus or renal disease, mean arterial pressure or 24-hour urine protein excretion. Over the period of six months of treatment with pulse injections of CYC, a dramatic reduction of proteinuria exceeding 80% was observed in the RE group, while in the N-RE group daily protein loss with urine decreased only a little, on average by 20% compared to baseline.

Prior to initiation of treatment with CYC there were no significant differences between the two groups with respect to creatinine level, total plasma protein, plasma albumin, serum cholesterol or serum triglycerides, as well as white blood count. Also creatinine clearance values were not significantly different in the two groups. The only finding was slightly lower blood hemoglobin level in the RE group. The most striking difference in results of laboratory tests between the groups was that in degree of erythrocyturia, which in the N-RE group was almost half that observed in the RE group. Moreover, the N-RE group showed much lower titer of ANA and lower serum IgG levels. Level of C3 was lower in the RE group, but the difference was not statistically significant.

For three tests: degree of erythrocyturia, titer of ANA and serum level of C3, distinct differences emerged between the RE and N-RE patients in response to CYC-based treatment. Erythrocyturia and titer of ANA are semi-quantitative tests. To enable processing of the obtained data and facilitate their interpretation, individual parameters were assigned linear-dependent point scores. Three markers were devised: Ecyt marker, ANA marker, and summative (ANA+Ecyt) marker. Also, the three most differentiating tests were combined into one [ANA+Ecyt]/C3 marker. Statistical analysis of the abovementioned markers was performed in both the groups, which revealed that the markers best reflecting the differences between the N-RE and RE patients are the summative ANA+Ecyt marker, as well as each of its individual component markers.

Following three months of treatment with CYC a major difference was observed for 24-hour urine protein excretion between the RE and N-RE patients. Parallel to this finding, much lower levels of total plasma protein and serum albumin were observed in the N-RE patients. These differences were even more prominent after six months of treatment with CYC. Additionally, statistically significant differences were noted for the basic lipid metabolism parameters: total cholesterol and serum triglycerides, both of which were higher in the N-RE patients. After six months of treatment with CYC degree of erythrocyturia in the N-RE patients proved to be double that found in the RE patients. Results of other tests, such as renal function parameters or blood hemoglobin level were not different between the RE and N-RE patients. However, in the N-RE group a certain minor reduction in daily urine protein loss was observed during the six-month cyclophosphamide treatment period. Comparison of degree of proteinuria before treatment and after six months of treatment revealed significant reduction from $6,4 \pm 3,2$ g/day to $4,2 \pm 0,5$ g/day ($p < 0,05$). Over the period of six months of CYC treatment a prominent decrease of the Ecyt marker was observed in the RE group, while the marker remained unchanged in the N-RE group. The greatest decline in the value of the Ecyt marker was found in the first two months of treatment and after the fourth month the marker was lower in the RE group of patients. Also, in the RE group a highly significant correlation was obtained between the Ecyt marker and relative per cent daily urine protein loss ($r = 0,97$; $p = 0,0004$). In the N-RE group this correlation was less pronounced ($r = 0,75$; $p < 0,05$).

Following six months of treatment in the RE group the markers Ecyt, ANA, ANA+Ecyt, and [ANA+Ecyt]/C3 decreased to the levels observed in the N-RE patients. In all the cases in the RE group values of these markers were significantly different from the baseline values at the beginning of treatment.

In the N-RE group there were no changes observed in the values of markers of the course of disease between baseline and at six months of CYC treatment. The only marker whose value increased at six months to similar levels in both the groups was serum level of C3. The obtained results confirm that the proposed markers (Ecyt and ANA), along with proteinuria, are very useful measures of efficiency of cyclophosphamide therapy.

Another stage of the research was evaluation of the maintenance therapy with either cyclophosphamide or other medications (Other) and its effect on the markers of the course of disease. An attempt was made to address the questions whether maintenance therapy is needed and whether any particular treatment can be regarded more efficient than others.

The results of basic lab tests obtained at nine and twelve months of treatment with CYC or Other medications were not significantly different from those recorded after six months of treatment. At these timepoints a significant difference between the RE and N-RE patients was still observed with respect to 24-hour urine protein. Also, in the N-RE patients distinctly lower levels of total protein and

serum albumin were noted. Additionally, N-RE patients demonstrated erythrocyturia, which was about 3 times greater than in the RE patients. Other investigations, such as renal function parameters or blood haemoglobin and lymphocyte count were not different in the two groups of patients. In the RE patients, treated with pulse injections of CYC (RE-CYC) or other medications (RE-Other) further reductions of urine protein excretion and erythrocyturia were obtained over the subsequent six months of treatment, whereas in the N-RE patients such changes were not observed, regardless of the type of maintenance treatment applied.

An additional objective of the research was evaluation of the effect of the applied immunosuppressive therapy on renal function parameters, such as: serum creatinine level and clearance of endogenous creatinine in both groups of patients. In the period of twelve months of immunosuppressive treatment serum creatinine concentration decreased from $1,41 \pm 0,12$ mg/dl to $1,06 \pm 0,05$ mg/dl in RE patients, while in the N-RE patients, following transient decline within the first months of therapy, it remained practically unchanged.

Similarly, in RE patients an increase of creatinine clearance was observed within the first six months of treatment, with further sustained stable levels. In N-RE patients clearance of endogenous creatinine did not change significantly over one year of immunosuppressive treatment.

An indirect objective of the research was also to assess the effect of immunosuppressive treatment on protein and lipid metabolism parameters. In the six-month period of CYC treatment RE patients demonstrated progressive increase of total protein and serum albumin levels. Parameters of protein metabolism remained stable throughout the period of maintenance treatment. In N-RE patients total protein in serum did not change significantly over the period of immunosuppressive treatment, while serum albumin level showed steady rising trend within one year of treatment and statistical significance of the difference was revealed in that case. Protein metabolism parameters were not significantly different between the groups, depending on the applied type of maintenance treatment.

Lipid metabolism parameters did not follow such distinct changes as the protein metabolism parameters. In RE patients significantly lower cholesterol level was observed only as late as after twelve months of treatment, and triglyceride level decreased significantly already after six months. In N-RE patients no major changes of lipid metabolism parameters were observed. There were no distinct differences between serum cholesterol and triglyceride levels in the two studied groups, depending on the type of maintenance treatment applied.

Summing up the presented information, and attempting to provide answers to the questions listed above in the objective of the research, we may suggest that some of the patients with lupus nephritis demonstrate high sensitivity to CYC-based therapy. These are the ones with signs of highly active nephritis and similar degree of activity of the systemic disease. Patients who respond well to CYC treatment characteristically exhibit marked erythrocyturia (amounting to about 20

erythrocytes in high-power field) and high titers of ANA (above 1: 640), with low serum levels of C3 component of the complement system (about 0,6-0,7 g/l) being a secondary marker. It is important to emphasize that the markers specially devised for the needs of this research, namely Ecyt, ANA, and combined Ecyt+ANA markers proved more useful and reliable in evaluation of individual patient's response to CYC treatment. Monitoring of efficiency of CYC-based treatment of lupus nephritis is based on evaluation of relative urine protein excretion and degree of erythrocyturia. Erythrocyturia is not only a parameter indicating activity of the nephropathy process but is also a parameter used for monitoring of the treatment, equally with proteinuria. Within the period of the first six months of CYC-based treatment most prominent changes in the described parameters of the course of disease are observed. Maintenance treatment with other immunosuppressive agents is as effective as administration of pulse injections of CYC every 3 months.

Therefore, we can agree that cyclophosphamide may still be regarded as first-line treatment in patients with disease of high immunological activity and with clinical manifestation of lupus nephritis in the form of proteinuria and marked erythrocyturia. Simultaneously, ANA marker provides a simple and reliable measure of immunological activity in lupus nephritis, with additional prognostic value, and the Ecyt marker proves to be another important clinical measure of disease, alongside changes in urine protein excretion.

Patients included to non responders on cyclophosphamide treatment, on the basis on examined markers seems to require a priori different immunosuppressive therapy (mycophenolate mofetil, biological drugs).