

УДК 616-008.853.2+576.315.42+616-076.5+616.611-002+616.12-008.46

Л.Є. Ковальчук, В.Я. Камінський, О.С. Ястребова

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

**АНАЛІЗ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ХРОМАТИНУ ЛІМФОЦИТІВ
У ХВОРИХ НА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ ПРИ РІЗНИХ СТАДІЯХ
ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК
ІЗ СУПУТНЬОЮ СЕРЦЕВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ТА БЕЗ НЕЇ**

Проаналізовано функціональний стан хроматину лімфоцитів у хворих на гломеруло-нефрит при різних стадіях хронічної хвороби нирок із супутньою серцевою недостатністю та без неї. Виявлено його порушення, особливо в пізніх стадіях захворювання та при коморбідній патології.

Ключові слова: *лімфоцити, хроматин, цитологічне дослідження, хронічна хвороба нирок, гломерулонефрит, серцева недостатність.*

В медичній практиці лікарям часто доводиться лікувати хворих із поєднанням кількох синдромів і захворювань. Такі ситуації зумовлені високою частотою останніх та їх тісними патогенетичними взаємозв'язками. Тому дослідження особливостей діагностики та лікування поєднаної патології є практично важливою та недостатньо вивченою галуззю медицини [1].

Поширення коморбідності складає від 69 % у хворих молодого віку (18–44 роки) до 93 % серед осіб середнього віку (45–64 роки) та до 98 % у пацієнтів старшої вікової групи (понад 65 років). Коморбідність посилює важкість стану хворого та погіршує його прогноз [2].

Науковцями встановлено, що існує тісний взаємозв'язок між хронічними захворюваннями нирок і серцево-судинною патологією, що привело до вживання терміну «кардіоренальний синдром» [3]. Застійна серцева недостатність (СН) зустрічається у 10–12 % хворих із хронічною хворобою нирок (ХХН), а серед пацієнтів, яким проводився перитонеальний діаліз або гемодіаліз, СН реєструвалася в 36 % випадків [1].

Уже давно з'ясовано, що гломерулонефрит має автоімунну природу [4], тому ключову роль у його розвитку відіграють імунно-

компетентні клітини – Т-лімфоцити. Їх субпопуляції активуються під впливом певних цитокінів, які діють на фактори активації транскрипції цих клітин, що приводить до відповідної регуляції експресії генів. Однак, окрім цього, в регуляторних процесах функцій лімфоцитів вагоме значення мають епігенетичні модифікації ступеня компактизації ядерного хроматину [5]. Розуміння епігенетичних механізмів диференціації лімфоцитів дозволить у майбутньому запобігати їх пошкодуючому впливу та сприяти утворенню корисних субпопуляцій [6].

Метою даного дослідження було вивчити особливості функціонального стану хроматину лімфоцитів у хворих на гломерулонефрит при різних стадіях ХХН із супутньою СН та без неї за індексами хроматизації, ядерцевим та морфологічно змінених ядер.

Матеріал і методи. Обстежено 75 хворих на гломерулонефрит при різних стадіях ХХН (38 чоловіків і 37 жінок) віком від 19 до 64 років, середній вік – (38,7±9,8) року. Пацієнтів було розділено на дві групи: 1-ша – із гломерулонефритом без СН (40 хворих), 2-га – із гломерулонефритом і СН (35 хворих). Діагноз гломерулонефриту встановлювали згідно з рекомендованими критеріями (Наказ МОЗ України № 593 від 12.12.2004 р.). З ме-

© Л.Є. Ковальчук, В.Я. Камінський, О.С. Ястребова, 2012

тою верифікації морфологічної форми захворювання хворим проводили пункційну біопсію нирки за допомогою біопсійного пістолета та одноразових голок фірми Bard Magnum з наступним дослідженням ниркового біоптата методами світлової й електронної мікроскопії та імуногістохімії. Також хворим проводили клініко-інструментальне обстеження згідно з протоколом надання медичної допомоги хворим на хронічну СН (Наказ МОЗ України № 436 від 03.07.2006 р.). До контрольної групи увійшли 30 практично здорових людей, порівнянних за віком і статтю до групи хворих.

Для цитогенетичного дослідження виготовляли мазки периферійної крові, які після висушування і фіксації забарвлювали за Фьольгеном у відповідній модифікації. Виявлення змін функціонального стану хроматину проводили шляхом аналізу інтерфазних ядер лімфоцитів. Препарати досліджували методом світлової мікроскопії за допомогою оптико-електронного комплексу Метаскан-2. У кожному препараті вивчали по 100 інтерфазних ядер з наступною оцінкою їх структурних характеристик: 1) індекс хроматизації – співвідношення кількості ядер із перевагою еухроматину до таких із перевагою гетерохроматину; 2) ядерцевий індекс – відсоток клітин із ядерцем; 3) індекс морфологічно змінених ядер – відсоток клітин із морфологічними змінами каріоплазми та/або каріолеми.

Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію Шапіро–Уїлка. Для ознак, що мають розподіл, відмінний від нормального, обчислювали медіани й інтерквартильні інтервали [Me (25 %; 75 %)]. Для порівняння двох незалежних груп за однією ознакою застосовували непараметричний критерій Манна–Уїтні. Критичний рівень статистичної значущості вважали рівним 5 %.

Результати та їх обговорення. При порівняльному аналізі показників функціонального стану лімфоцитів у хворих на гломерулонефрит при різних стадіях ХХН і у практично здорових людей було виявлено низку статистично значущих відмінностей (табл. 1).

Першочергово проаналізовано стан конденсації хроматину, що відображає індекс хроматизації [7]. У практично здорових людей процеси переходу гетеро- в еухроматин перебігали активно, з невеликою перевагою

у чоловіків. Статистично значуще зниження індексу хроматизації спостерігалось у жінок при III–V стадіях, тоді як у чоловіків лише при V стадії, на відміну від практично здорових осіб. Вірогідних відмінностей між обома статями у кожній групі зафіксовано не було. Отримані закономірності свідчать про вираженіше гальмування експресії генів у хворих жінок, особливо в пізніх стадіях ХХН. Це можна пояснити більш вираженими компенсаторними можливостями метаболізму лімфоцитів у хворих чоловіків порівняно із тими у жінок.

Оскільки показником трансляційних процесів може бути активність ядерцевого апарату, вивчено зміни ядерцевого індексу залежно від статі у практично здорових людей. Виявлено вищий ядерцевий індекс у чоловіків, ніж у жінок, що вказує на узгодженість у кожній статі між різними етапами реалізації спадкової інформації. У хворих на гломерулонефрит у порівнянні з практично здоровими особами виявлено статистично значуще підвищення ядерцевого індексу у жінок від II, а у чоловіків від III стадії і вище, причому в перших більш виражене. Вагома різниця між статями ($p < 0,05$) за вказаним індексом відзначалася лише при пізніх (IV–V) стадіях. Оскільки у хворих жінок спостерігалось гальмування деконденсації хроматину, то компенсаторно для забезпечення необхідної для клітини кількості білка помітніше активувалися трансляційні процеси.

Функція генотипу лімфоцита безпосередньо залежить і від цілісності його каріолеми, наявності внутрішньоядерних везикул, тобто від морфологічних змін компонентів ядра. Індекс морфологічно змінених ядер статистично значуще підвищувався у пацієнтів обох статей при всіх стадіях порівняно з практично здоровими особами, що в результаті змінювало конденсацію хроматину й процеси транскрипції, причому вираженіше при прогресуванні захворювання.

Водночас за даним індексом спостерігалася вагома різниця ($p < 0,01$) між різними статями лише при II і III стадіях ХХН. При цьому морфологічні зміни компонентів ядра були більш вираженими у жінок, що може вказувати на більшу стійкість ядер лімфоцитів у хворих чоловіків при початкових стадіях захворювання.

Таблиця 1. Цитологічні показники лімфоцитів крові у хворих на гломерулонефрит при різних стадіях хронічної хвороби нирок, Me (25 %; 75 %)

Стадія хронічної хвороби нирок	Стать	Індекси		
		хроматизації, ум. од.	ядерцевий, %	морфологічно змінених ядер, %
I	Обидві (n=16)	0,73 (0,67; 0,98)	5,14 (4,28; 6,10)	5,35 (4,21; 7,71) [^]
	Чол. (n=8)	0,76 (0,70; 0,98)	5,00 (4,28; 6,10)	4,98 (3,89; 7,36) [#]
	Жін. (n=8)	0,72 (0,64; 0,93)	5,23 (4,28; 6,07)	5,59 (4,43; 8,34) [#]
II	Обидві (n=16)	0,77 (0,70; 0,91)	6,25 (5,08; 7,11) [*]	10,81 (9,40; 12,75) [^]
	Чол. (n=8)	0,86 (0,70; 0,94)	5,08 (4,47; 6,72)	9,40 (8,19; 10,81) [^]
	Жін. (n=8)	0,73 (0,70; 0,80)	6,31 (5,77; 7,37) [*]	12,75 (11,35; 13,38) ^{^##}
III	Обидві (n=15)	0,65 (0,55; 0,82)	8,24 (6,51; 9,03) [^]	14,87 (12,86; 16,08) [^]
	Чол. (n=8)	0,81 (0,58; 0,88)	7,42 (5,90; 8,52) [#]	12,87 (12,82; 13,73) [^]
	Жін. (n=7)	0,58 (0,54; 0,77) [*]	8,24 (7,89; 9,91) [^]	16,08 (14,91; 17,05) ^{^##}
IV	Обидві (n=14)	0,61 (0,51; 0,74) [#]	9,43 (8,67; 10,11) [^]	17,90 (17,15; 18,64) [^]
	Чол. (n=7)	0,74 (0,60; 0,87)	8,67 (7,14; 9,43) [#]	17,83 (16,35; 19,06) [^]
	Жін. (n=7)	0,52 (0,48; 0,62) [#]	10,11 (9,15; 11,08) ^{^**}	17,94 (17,38; 18,64) [^]
V	Обидві (n=14)	0,52 (0,43; 0,61) [^]	10,02 (9,37; 10,97) [^]	17,83 (16,89; 18,68) [^]
	Чол. (n=7)	0,58 (0,57; 0,63) [*]	9,37 (8,62; 10,05) [^]	17,71 (16,87; 18,68) [^]
	Жін. (n=7)	0,45 (0,35; 0,46) [#]	10,97 (9,75; 11,41) ^{^**}	18,50 (17,16; 19,89) [^]
Практично здорові	Обидві (n=30)	0,79 (0,62; 1,05)	4,33 (3,19; 6,14)	2,97 (1,78; 4,02)
	Чол. (n=15)	0,82 (0,61; 1,10)	4,38 (3,19; 6,74)	2,87 (1,78; 3,25)
	Жін. (n=15)	0,78 (0,62; 1,01)	4,29 (3,15; 5,41)	3,07 (1,72; 4,35)

Примітка. 1. * p<0,05; # p<0,01; ^ p<0,001; достовірно у порівнянні з групою практично здорових; 2. ** p<0,05; ## p<0,01; достовірно у порівнянні з жінками у кожній групі хворих.

При поділі хворих на дві групи залежно від наявності чи відсутності у них супутньої СН також було виявлено статистично значущі відмінності функціонального стану хроматину лімфоцитів (табл. 2).

Статистично суттєве зниження індексу хроматизації зафіксовано лише у хворих із супутньою СН порівняно зі здоровими особами і хворими без СН. Описані зміни виявилися більш вираженими у жінок. Значущою була різниця між статями в групі хворих із СН (p<0,05). Встановлені зміни індексу хроматизації лімфоцитів пов'язані з більш важким станом хворих через супутню СН.

У хворих обох груп відзначалося статистично вагоме підвищення ядерцевого індексу, причому суттєвіше в групі без супутньої патології. Це свідчить про певне виснаження

компенсаторної активації біосинтетичних процесів у пацієнтів із СН. Значуща різниця між групами спостерігалася тільки у чоловіків (p<0,05). Суттєвою виявилася й різниця між статями в групі хворих із СН (p<0,05).

Вірогідні зміни морфологічно змінених ядер лімфоцитів відзначалися в обох групах (p<0,001), причому вагоміше підвищення зафіксовано у пацієнтів із супутньою СН, що зумовлено вираженішими порушеннями організму внаслідок асоціації двох патологій. Вагомі порушення нормальної структури ядер спостерігалися у жінок (p<0,05), що вказує на кращі компенсаторні можливості метаболізму лімфоцитів у чоловіків.

Висновки

1. Проведеним порівняльним аналізом цитогенетичних характеристик лімфоцитів

Таблиця 2. Цитологічні показники лімфоцитів крові у хворих на гломерулонефрит з СН та без неї, Me (25 %; 75 %)

Група дослідження	Стать	Індекси		
		хроматизації, ум. од.	ядерцевий, %	морфологічно змінених ядер, %
Практично здорові	Обидві (n=30)	0,79 (0,62; 1,05)	4,33 (3,19; 6,14)	2,97 (1,78; 4,02)
	Чол. (n=15)	0,82 (0,61; 1,10)	4,38 (3,19; 6,74)	2,87 (1,78; 3,25)
	Жін. (n=15)	0,78 (0,62; 1,01)	4,29 (3,15; 5,41)	3,07 (1,72; 4,35)
Хворі на гломерулонефрит без СН	Обидві (n=40)	0,76 (0,63; 0,90)	8,42 (6,43; 9,95) [^]	12,82 (7,97; 15,57) [^]
	Чол. (n=21)	0,83 (0,72; 0,92)	8,33 (6,28; 9,37) [^]	12,64 (7,49; 14,09) [^]
	Жін. (n=19)	0,71 (0,62; 0,81)	8,94 (7,06; 10,76) [^]	12,94 (8,74; 17,15) [^]
Хворі на гломерулонефрит з СН	Обидві (n=35)	0,58 (0,46; 0,72) ^{^1^}	6,28 (5,09; 8,72) ^{^1*}	16,87 (10,18; 18,03) ^{^1#}
	Чол. (n=17)	0,65 (0,56; 0,79) ^{*1*}	5,91 (4,91; 7,92) ^{*1*}	16,35 (9,28; 17,94) [^]
	Жін. (n=18)	0,52 (0,46; 0,62) ^{^**1#}	8,07 (5,43; 9,97) ^{^**}	17,09 (13,86; 18,49) ^{^1*}

Примітка. 1. * p<0,05; # p<0,01; ^ p<0,001; достовірно у порівнянні з групою практично здорових;
2. ** p<0,05, між чоловіками та жінками у кожній групі хворих із різними синдромами;
3. ^{1*} p<0,05; ^{1#} p<0,01; ^{1^} p<0,001, між групами хворих з СН та без неї.

крові хворих на гломерулонефрит при різних стадіях хронічної хвороби нирок та при наявності супутньої серцевої недостатності і без неї виявлено порушення співвідношення конденсації/деконденсації хроматину, активності ядерцевого апарату та нормальної структури ядер залежно від тяжкості перебігу коморбідної патології. Доведено, що більш виражені зміни функціонального стану хроматину лімфоцитів відзначаються у пацієнтів із пізніми стадіями хронічної хвороби нирок

та при наявності супутньої серцевої недостатності, причому частіше у хворих жіночої статі.

Перспективи подальших досліджень полягатимуть у пошуку нових лікарських засобів, які б могли позитивно впливати на змінений функціональний стан хроматину лімфоцитів у хворих на гломерулонефрит, та вивченні взаємозв'язків між цитогенетичними маркерами лімфоцитів і вираженістю їх апоптозу.

Список літератури

1. *Белялов Ф. И.* Лечение внутренних болезней в условиях коморбидности : монография / Ф. И. Белялов. – Иркутск : РИО ИГМАПО, 2011. – 308 с.
2. Коморбидность / А. Л. Вёрткин, М. А. Румянцев, А. С. Скотников [и др.] // Актуальные вопросы болезней сердца и сосудов. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 42–49.
3. *Berberi A. E.* Cardiorenal syndrome: mechanisms, risk and treatment / A. E. Berbari, G. Mancina. – Milan : Springer-Verlag, 2010. – 396 p.
4. Autoimmunity and glomerulonephritis / R. Saxena, C. Johansson, P. Bygren, J. Wieslander // Postgrad. Med. J. – 1992. – № 68. – P. 242–250.
5. Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics / K. Hirahara, G. Vahedi, K. Ghoreschi [et al.] // Immunology. – 2011. – № 134 (3). – P. 235–245.
6. *Lopez-Granados E.* Epigenetic control of lymphocyte differentiation / E. Lopez-Granados // Adv. Exp. Med. Biol. – 2011. – № 711. – P. 26–35.
7. *Гвоздев В. А.* Гетерохроматин и его функциональные характеристики / В. А. Гвоздев, Л. А. Усакин, Р. Л. Коган // Мед. генетика. – 2003. – Т. 2, № 7. – С. 290–296.

Л.Е. Ковальчук, В.Я. Каминский, О.С. Ястребова

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ХРОМАТИНА ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК С СОПУТСТВУЮЩЕЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И БЕЗ НЕЁ

Выполнен анализ функционального состояния хроматина лимфоцитов у больных гломерулонефритом при разных стадиях хронической болезни почек с сопутствующей сердечной недостаточностью и без неё. Обнаружено его нарушение, особенно в поздних стадиях заболевания и при коморбидной патологии.

Ключевые слова: лимфоциты, хроматин, цитологическое исследование, хроническая болезнь почек, гломерулонефрит, сердечная недостаточность.

L.Ye. Kovalchuk, V.Ya. Kaminskiy, O.S. Yastrebova

ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL STATE OF LYMPHOCYTES' CHROMATIN IN PATIENTS WITH GLOMERULONEPHRITIS AT DIFFERENT STAGES OF CHRONIC KIDNEY DISEASE WITH ACCOMPANYING HEART FAILURE AND WITHOUT IT

After spending analysis of the functional state of lymphocytes' chromatin in patients with glomerulonephritis at different stages of chronic kidney disease with accompanying heart failure and without it, we found its violations, especially in the advanced stages of the disease and at the comorbid pathology.

Key words: lymphocytes, chromatin, cytological study, chronic kidney disease, glomerulonephritis, heart failure.

Поступила 15.03.12