

© Камінський В.Я., Ковальчук Л.Є., 2012

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

В. Я. КАМІНСЬКИЙ, Л. Є. КОВАЛЬЧУК

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛІМФОЦИТІВ У ХВОРИХ
НА ХРОНІЧНУ ХВОРОБУ НИРОК, ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ**

V. YA. KAMINSKYI, L. YE. KOVALCHUK

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS
WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE, GLOMERULONEPHRITIS**

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Ключові слова: лімфоцити, хроматин, інтерфазне ядро, цитологічне дослідження, хронічна хвороба нирок, гломерулонефрит.

Резюме. *Необходимо разрабатывать маркеры генетического скрининга, которые позволят диагностировать мультифакторные заболевания на начальных стадиях и определять эффективность их лечения. Целью данной работы стало изучение особенностей структурно-функционального состояния хроматина и ядер лимфоцитов периферической крови пациентов с хронической болезнью почек, гломерулонефритом. Обследовано 75 больных. Для цитологического исследования изготавливали мазки периферической крови и проводили анализ интерфазных ядер лимфоцитов. Выявлены изменения компактизации хроматина, активности ядрышкового аппарата и морфологически измененных ядер, которые отражают состояние транскрипционно-трансляционного процесса в клетке. Установлены особенности структурно-функциональных показателей метаболизма лимфоцитов в зависимости от пола пациентов и синдрома заболевания. Исследованные цитологические маркеры можно использовать для диагностики этой патологии на начальных стадиях и с целью оценки эффективности проводимого лечения.*

Summary. *It is necessary to develop markers of genetic screening, that will enable diagnostics of multifactorial diseases in the early stages and determine the effectiveness of their treatment. The aim of this work was to study the structural and functional features of chromatin and nuclei of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic kidney disease, glomerulonephritis. 75 patients were examined. For cytological study smears of peripheral blood were made and conducted analysis of lymphocytes' nuclei in interphase. Changes of the chromatin compaction, activity of nucleolar apparatus and morphologically changed nuclei were detected, reflecting the state of transcriptionally-translational process in the cell. The features of the structural and functional parameters of lymphocytes' metabolism in patients according to sex and disease syndrome were established. Investigated cytological markers can be used for diagnostics this pathology at early stages and to evaluate the effectiveness of the treatment.*

**Камінський Віталій Ярославович
(0342) 528-171**

ВСТУП. В організмі кожної людини протягом життя координовано функціонують трильйони клітин, кожна з яких відрізняється диференційною експресією генів. Будь-який з останніх може стати мішенню несприятливого впливу екзогенних чинників, що призводить до виникнення патології [1].

Останнім часом медична наука досягла значних успіхів у розумінні генетичних основ різноманітних захворювань. З'ясовано роль певних генів у розвитку та прогресуванні багатьох із них. Яскраві досягнення відбулися також і в нефрології, особливо при моногенних патологіях [7]. Але генетичні основи мультифакторних захворювань, розвиток яких залежить від складної взаємодії між генами та чинниками довкілля, залишаються ще недостатньо зрозумілими. До таких захворювань належить гломерулонефрит (ГН) [5]. Генетичні та епігенетичні дослідження є інтригуючою ділянкою для майбутніх досліджень та все більше відкриватимуть перспективи кращої діагностики вказаної патології та сприятимуть удосконаленню її терапії [4, 6]. На думку вчених, необхідно розробляти маркери генетичного скринінгу для достовірної предикторної інформації, що дасть змогу проводити швидко діагностику мультифакторних захворювань на початкових стадіях та визначати ефективність проведеного лікування [1].

Першочергову роль у розвитку автоімунних захворювань, прикладом яких є ГН, відіграють імунокомпетентні клітини – Т- і В-лімфоцити [8, 9, 10].

МЕТОЮ даної роботи стало вивчення особливостей структурно-функціонального стану хроматину (ФСХ) та ядер лімфоцитів периферійної крові пацієнтів із хронічною хворобою нирок (ХХН), ГН за індексами хроматизації, ядерцевим та морфологічно змінених ядер.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 75 хворих на ХХН, ГН (38 чоловіків та 37 жінок) віком від 19 до 64 років (середній вік становив $38,7 \pm 9,8$ року). Діагноз встановлювали згідно з рекомендованими критеріями (наказ МОЗ України № 593 від 12.12.2004 року).

З метою верифікації морфологічної форми захворювання хворим проводили пункційну біопсію нирки за допомогою біопсійного пістолету та одноразових голок фірми Bard Magnum з наступним дослідженням ниркового біоптату методами світлової й електронної мікроскопії та імуногістохімії. До контрольної групи ввійшли 30 практично здорових людей, відповідних за віком та статтю до групи хворих.

Для цитологічного дослідження виготовляли мазки периферійної крові, які після висушування і фіксації забарвлювали за Фьольгеном у відповідній модифікації [2]. Виявлення змін ФСХ проводили аналізом 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 (ІХ) – співвідношення кількості ядер із перевагою еухроматину до таких із перевагою гетерохроматину; 2) ядерцевий індекс (ЯІ) – відсоток клітин із ядерцем; 3) індекс морфологічно змінених ядер (МЗЯ) – відсоток клітин із морфологічними змінами каріоплазми та/або каріолеми.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакета прикладних програм Statistica 6.1. Нормальність розподілу кількісних ознак перевіряли з використанням критерію Шапіро-Уїлка. Для ознак, що мають розподіл, відмінний від нормального, обчислювали медіани й інтерквартильні інтервали. Дані в таблицях представлені у вигляді медіани, 25-го й 75-го квартилів – Me (25%; 75%). Для порівняння двох незалежних груп за однією ознакою застосовували непараметричний критерій Манна-Уїтні. Для вивчення взаємозв'язку двох ознак використали кореляційний аналіз за Спірменом. Критичний рівень статистичної значущості вважали рівним 5%.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. При порівняльному аналізі показників ФСХ лімфоцитів у хворих на ХХН, ГН та у практично здорових людей було виявлено низку статистично значущих відмінностей (табл. 1).

Таблиця 1

Цитологічні показники лімфоцитів периферійної крові обстежених пацієнтів, Me (25%; 75%)

Індекси	Практично здорові			Хворі на хронічну хворобу нирок, гломерулонефрит		
	обидві статі (n=30)	чоловіки (n=15)	жінки (n=15)	обидві статі (n=75)	чоловіки (n=38)	жінки (n=37)
Хроматизації, ум.од.	0,79 (0,62; 1,05)	0,82 (0,61; 1,10)	0,78 (0,62; 1,01)	0,67 (0,55; 0,81)**	0,75 (0,60; 0,88)	0,62 (0,51; 0,73)** #
Ядерцевий, %	4,33 (3,19; 6,14)	4,38 (3,19; 6,74)	4,29 (3,15; 5,41)	7,92 (5,68; 9,43)***	6,99 (5,09; 8,67)**	8,42 (6,27; 10,11)*** #
Морфологічно змінених ядер, %	2,97 (1,78; 4,02)	2,87 (1,78; 3,25)	3,07 (1,72; 4,35)	13,86 (8,98; 17,38)***	12,85 (8,44; 16,89)***	14,91 (10,18; 17,53)***

Примітки: 1. Статистична значущість відмінностей показників згідно статі у групі хворих порівняно з групою практично здорових: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.
2. Статистична значущість відмінностей показників у чоловіків порівняно з жінками у групі хворих на ГН: # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001.

Встановлено, що стан компактизації хроматину відображає функцію геному, зокрема першого етапу реалізації спадкової інформації [3]. Цитологічним виявом останнього є IX. У пацієнтів спостерігався статевий диморфізм щодо IX: порівняно із практично здоровими особами у хворих жінок – статистично значуще зниження, тоді як у чоловіків вірогідних змін не виявлено. Зафіксовані зміни можна пояснити більш вираженими компенсаторними можливостями метаболізму лімфоцитів у хворих чоловіків порівняно з такими у жінок.

Порівняльним аналізом активності ядерцевого апарату, який опосередковано вказує на вираженість трансляції, ЯІ виявлено вищий у практично здорових чоловіків, аніж у жінок. Це може вказувати на узгодженість у кожній статі між першим та другим етапами реалізації спадкової інформації у лімфоцитах. У хворих на ХХН, ГН виявлено статистично значуще підвищення ЯІ порівняно з практично здоровими

особами, причому в жінок більш виражене, ніж у чоловіків. Отриманий факт можна пояснити компенсаторним зростанням активності ядерцевого апарату в умовах посиленої гетерохроматизації для забезпечення необхідної для лімфоцита кількості білка.

Функція генотипу безпосередньо залежить і від цілісності каріолеми, наявності внутрішньоядерних вакуолей, тобто від морфологічних змін компонентів ядра. Індекс МЗЯ лімфоцитів статистично значуще підвищувався в усіх пацієнтів порівняно з практично здоровими особами, що в результаті змінювало конденсацію хроматину та, відповідно, процеси транскрипції. Водночас за даним індексом вірогідної різниці між статями не спостерігалось.

Розділивши пацієнтів на дві групи залежно від наявного у них синдрому (сечового або нефротичного), також було виявлено статистично значущі відмінності показників ФСХ лімфоцитів (табл. 2).

Таблиця 2

Цитологічні показники лімфоцитів периферійної крові пацієнтів залежно від клінічного синдрому, Me (25%; 75%)

Індекси	Хворі із сечовим синдромом			Хворі із нефротичним синдромом		
	обидві статі (n=46)	чоловіки (n=22)	жінки (n=24)	обидві статі (n=29)	чоловіки (n=16)	жінки (n=13)
Хроматизації, ум.од.	0,74 (0,61; 0,84)	0,82 (0,65; 0,91)	0,68 (0,56; 0,78) [#]	0,57 (0,48; 0,71) ^{***@@}	0,63 (0,55; 0,78) ^{*@}	0,52 (0,46; 0,62) ^{***@}
Ядерцевий, %	8,83 (7,14; 10,05) ^{***}	8,40 (6,28; 9,37) ^{***}	9,50 (8,07; 10,65) ^{***#}	5,91 (4,91; 7,68) ^{***@@@}	5,39 (4,47; 7,00) ^{@@}	6,71 (5,27; 8,13) ^{**@@}
Морфологічно змінених ядер, %	12,58 (7,42; 15,30) ^{***}	10,81 (7,23; 12,87) ^{***}	13,35 (8,34; 16,57) ^{***}	17,16 (14,87; 18,64) ^{***@@@}	16,61 (13,09; 18,26) ^{***@@}	17,53 (16,93; 18,64) ^{***@@}

- Примітки: 1. Статистична значущість відмінностей показників згідно статі у кожній групі хворих порівняно з групою практично здорових: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.
2. Статистична значущість відмінностей показників у чоловіків порівняно з жінками у кожній групі хворих з різними синдромами: # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001.
3. Статистична значущість відмінностей показників згідно статі у групах хворих із різними синдромами: @ p<0,05; @@ p<0,01; @@@ p<0,001.

У пацієнтів із сечовим синдромом вірогідних змін IX зафіксовано майже не було, за винятком зниження вказаного показника у жінок порівняно із таким у чоловіків (p<0,05). Водночас у хворих на нефротичний синдром, порівняно із практично здоровими, спостерігалось статистично значуще зниження цього індексу в обох статей, причому вираженіше у жінок. Порівнянням IX лімфоцитів у пацієнтів із різними синдромами виявлено його суттєве зниження в обох статей при нефротичному синдромі (p<0,05). Отримані зміни IX пов'язані з важчим станом хворих на нефротичний синдром і, відповідно, вираженішими у них порушеннями процесів деконденсації хроматину.

Статистично значуще підвищення ЯІ лімфоцитів порівняно зі здоровими особами відзначалося у пацієнтів обох статей із сечовим синдромом.

Водночас при вказаному синдромі суттєвішим виявилось зростання цього показника у жінок порівняно із таким у чоловіків (p<0,05). При нефротичному синдромі ЯІ лімфоцитів вірогідно не відрізнявся у хворих чоловіків порівняно зі здоровими, а в жінок значуще підвищувався (p<0,01). Порівнянням груп пацієнтів із різними синдромами зафіксовано вираженіші зміни ЯІ в обох статей при сечовому синдромі (p<0,01). Це може свідчити про суттєвішу компенсаторну активацію трансляційних процесів у хворих на сечовий синдром та про певне її виснаження у пацієнтів із нефротичним синдромом.

Зростання індексу МЗЯ лімфоцитів спостерігалось у пацієнтів обох статей при різних синдромах (p<0,001). Статистично більш значуще підвищення цього показника зафіксовано у хворих із нефротичним синдромом, що зумовлено

вираженішими порушеннями організму та важчим ураженням структур нирок при нефротичному синдромі порівняно із сечовим.

Підсумковим етапом роботи було проведення кореляційного аналізу між різними показниками каріограми лімфоцитів. Так, у всій групі хворих на ХХН, ГН виявлено негативний кореляційний зв'язок середньої сили між ІХ та індексом МЗЯ ($r=-0,48$; $p<0,001$). Подібні результати зафіксовано і в чоловіків ($r=-0,43$; $p<0,01$), і в жінок ($r=-0,42$; $p<0,01$). Це може свідчити, що вищий відсоток МЗЯ лімфоцитів погіршує контакт хроматину з патологічно зміненою каріолею, тобто не забезпечується достатня деспіралізація ДНК, тому суттєвіше гальмуються процеси транскрипції. У хворих чоловіків спостерігався також позитивний кореляційний зв'язок середньої сили між ЯІ та індексом МЗЯ ($r=0,65$; $p<0,001$), що може вказувати на активацію трансляційних процесів при зростанні кількості пошкоджених ядер лімфоцитів, щоб компенсувати сповільнення транскрипції. Аналогічні зміни відзначено й у групі всіх хворих ($r=0,40$; $p<0,001$). У них же зафіксовано негативну кореляцію слабкої сили між ІХ та ЯІ ($r=-0,28$; $p<0,05$), що опосередковано свідчить про компенсаторну узгодженість між першим та другим етапами реалізації спадкової інформації у групі всіх пацієнтів.

ВИСНОВКИ. Проведеним порівняльним аналізом цитогенетичних характеристик інтерфазних лімфоцитів периферійної крові хворих на ХХН, ГН виявлено в них зміни компактизації хроматину, активності ядерцевого апарату та морфологічно змінених ядер, які відображають стан транскрипційно-трансляційного процесу в клітині. Встановлено особливості структурно-функціональних показників метаболізму на клітинному рівні залежно від статі пацієнтів та переважачого синдрому захворювання. Досліджені цитологічні маркери можна застосовувати для діагностики цієї патології на початкових стадіях та з метою оцінки ефективності проведеного лікування.

Перспективи подальших досліджень полягатимуть у пошуку нових лікарських засобів, які би могли позитивно впливати на порушений ФСХ

лімфоцитів у хворих на ХХН, ГН, та вивченні взаємозв'язків між цитологічними маркерами лімфоцитів та вираженістю їх апоптозу.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Запорожан В. М.* Генетичні передумови здоров'я нації / В. М. Запорожан // Журнал АМН України. — 2007. — Т. 13, № 3. — С. 455-463.
2. Рационалізаторська пропозиція № 30/2319. Виявлення ДНК в цитологічних препаратах [Текст] / Л. Є. Ковальчук, Н. В. Ковальчук, В. І. Ілик. — Івано-Франківськ, 1997. — 5 с.
3. *Тепляков А. И.* Топография интерфазного хроматина нейтрофильных гранулоцитов при атеросклерозе: еще одно подтверждение экспрессии генов для завершения ими функциональной программы / А. И. Тепляков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2004. — № 2. — С. 40-43.
4. *Chmielewski M.* The role of epigenetics in kidney diseases / M. Chmielewski [et al.] // Contributions, Sec. Biol. Med. Sci., MASA. — 2011. — № 1. — P. 45-54.
5. *Flinter F.* The Genetics of Renal Disease [Text] / F. Flinter, E. Maher, A. Saggari-Malik. — New York: Oxford University Press, 2003. — 568 p. — ISBN 0192631462.
6. Genetic Diseases of the Kidney [Text] / R. P. Lifton, S. Somlo, G. H. Giebisch, D. W. Seldin. — Elsevier Inc., 2009. — 813 p. — ISBN 9780124498518.
7. *Gigante M.* Molecular and Genetic Basis of Inherited Nephrotic Syndrome / M. Gigante [et al.] // Int. J. Nephrol. — 2011. — Vol. 2011. — P. 162-177.
8. *Kurts C.* Constructing an immune system for glomerulonephritis studies / C. Kurts // J. Am. Soc. Nephrol. — 2011. — № 22. — P. 398-399.
9. *Tipping P. G.* Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? / P. G. Tipping, A. R. Kitching // Clin. and Exp. Immunology. — 2005. — № 142. — P. 207-215.
10. *Zouali M.* Molecular Autoimmunity [Text] / M. Zouali. — New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2005. — 437 p. — ISBN 0-387-24533-2.

Надійшла до редакції 19.03.2012

Прийнята до друку 10.05.2012