

В.Я. Камінський

ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ ІЗ РІЗНИМИ СТАДІЯМИ ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК ІЗ СУПУТНЬОЮ СЕРЦЕВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ТА БЕЗ НЕЇ

*ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»
кафедра внутрішньої медицини № 1 з курсом клінічної імунології
та алергології ім. акад. Нейка Є.М.
(зав. каф. – проф. Р.І. Яцишин)*

Ключові слова: нейтрофіли, хроматин, цитологічне дослідження, хронічна хвороба нирок, гломерулонефрит, серцева недостатність

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

Резюме. Целью данной работы стало изучение особенностей функционального состояния нейтрофилов периферической крови больных гломерулонефритом с разными стадиями хронической болезни почек (ХБП) с сопутствующей сердечной недостаточностью (СН) и без неё. Обследовано 75 больных. Для цитологического исследования изготавливали мазки периферической крови и проводили анализ интерфазных ядер нейтрофилов. Выявлены нарушения всех показателей транскрипционно-трансляционного аппарата. Более выраженными оказались изменения функционального состояния нейтрофилов у пациентов с поздними стадиями ХБП и при наличии сопутствующей СН, причем чаще у мужчин.

Summary. The aim of this work was to study the features of functional state of peripheral blood neutrophils in patients with glomerulonephritis on different stages of chronic kidney disease (CKD) and concomitant heart failure (HF) or without it. 75 patients were examined. For cytological study the smears of peripheral blood were made and analysis of neutrophils nuclei in interphase was conducted. The disturbances of all indicators of transcription-translation system were detected. More pronounced changes in the functional state of neutrophils were in patients with advanced stages of CKD and in the presence of concomitant HF, and more often in men.

Проблема лікування хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН) залишається надзвичайно актуальною та складною [2]. У міру погіршення функції нирок поступово збільшується ризик кардіоваскулярної смертності, який у пацієнтів із нирковою недостатністю в 3,4 рази вищий, ніж в осіб із нормальною швидкістю клубочкової фільтрації [9]. Давно відомо, що існує тісний взаємозв'язок між хронічними захворюваннями нирок і серцево-судинною патологією, що призвело до вживання терміну "кардіоренальний синдром". Первинні захворювання нирок пов'язані з посиленням прогресування серцево-судинних захворювань, навіть у тих випадках, коли функція нирок лише незначно порушена [4]. За даними провідних світових медичних організацій, поширеність серцево-судинної патології у хворих із V стадією ХХН становить 40-50% (у загальній популяції – 5-12 %) [2]. У дослідженні, проведеному в США, науковці виявили, що у хворих із ХХН недіабетичної етіології частота розвитку серцевої недостатності (СН) протягом одного року становила 30,7% [5].

Значна кількість пацієнтів із ХХН помирають від кардіоваскулярних ускладнень, перш ніж вони досягнуть кінцевої п'ятої стадії захворювання. З'ясовано, що в нефрологічних пацієнтів віком 25-34 роки кардіоваскулярна летальність у 120 разів вища, ніж у тій же віковій групі в загальній популяції, а для вікової групи 55-64 роки це співвідношення становить 1:15 [2]. Розуміння механізмів, що пов'язують ХХН і серцево-судинні захворювання, необхідне для вироблення майбутніх терапевтичних підходів до цієї смертельної асоціації [4]. Однією з основних причин ХХН є гломерулонефрит (ГН), в патогенезі якого певну роль відіграють і нейтрофільні гранулоцити [7].

Генетичні дослідження захворювань нирок дають потенційні маркери цієї патології, які стають мішенями для терапевтичних втручань [6]. Епігенетичні модифікації геному в пацієнтів із кардіоренальним синдромом залишаються активною областю наукових досліджень і потребують подальшого вивчення [8].

Метою цього дослідження стало вивчення особливостей функціонального стану нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові хворих на ГН із різними стадіями ХХН із супутньою СН та без неї за індексами хроматизації, статевого хроматину, ядерцевим та морфологічно змінених ядер.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Обстежено 75 хворих на ГН із різними стадіями ХХН (38 чоловіків та 37 жінок) віком від 19 до 64 років, середній вік становив $38,7 \pm 9,8$ року. Пацієнтів було розділено на дві групи: перша – із ГН без СН (40 хворих), друга – із ГН та СН (35 хворих). Діагноз ГН 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 пістолета та одноразових голок фірми Bard Magnum з подальшим дослідженням ниркового біоптату методиками світлової й електронної мікроскопії та імуногістохімії. Також пацієнтам проводили клініко-інструментальне обстеження згідно з протоколом надання медичної допомоги хворим на хронічну СН (наказ МОЗ України № 436 від 03.07.2006 року). До контрольної групи увійшли 30 практично здорових людей, відповідних за віком та статтю до групи хворих.

Для цитогенетичного дослідження виготовляли мазки периферійної крові, які після висушування і фіксації забарвлювали за Фьольгеном у відповідній модифікації [3]. Виявлення змін функціонального стану хроматину проводили аналізом інтерфазних ядер нейтрофільних гранулоцитів. Препарати досліджували методом світлової мікроскопії за допомогою оптико-електронного комплексу Метаскан-2. У кожному препараті вивчали по 100 інтерфазних ядер з такою оцінкою їх структурних характеристик: 1) індекс хроматизації (IX) – співвідношення кількості ядер із перевагою еухроматину до таких із перевагою гетерохроматину; 2) ядерцевий індекс (ЯІ) – відсоток клітин із ядерцем; 3) індекс статевого хроматину (СХ) – відсоток клітин із гетеропікнотичною Х-хромосомою; 4) 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 інтер-

квартильні інтервали. Дані в таблиці представлені у вигляді медіани, 25-го й 75-го квартилів – Ме (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 нейтрофільних гранулоцитів у хворих на ГН з різними стадіями ХХН та у практично здорових людей було виявлено низку статистично значущих відмінностей (табл. 1).

Встановлено, що цитологічним відображенням функції хроматину є стан його компактизації [1]. Так, IX опосередковано вказує на активність транскрипції – першого етапу реалізації спадкової інформації. У практично здорових людей цей процес перебігав активно, з невеликою перевагою у чоловіків. У пацієнтів, порівняно із практично здоровими особами, статистично значуще зниження IX спостерігалось лише у чоловіків у пізніх (IV та V) стадіях, тоді як у жінок вірогідних змін не виявлено. Вагомі відмінності ($p < 0,05$) між обома статтями зафіксовано лише у V стадії. Отримані закономірності свідчать про вираженіше гальмування деспіралізації ДНК у хворих чоловіків, особливо в пізніх стадіях ХХН. Це можна пояснити за рахунок більш виражених компенсаторних можливостей метаболізму клітин у хворих жінок порівняно з чоловіками.

Другим етапом реалізації спадкової інформації є біосинтез білка на комплексі рибосома та інформаційна РНК, вираженість якого відображає активність ядерцевого апарату. ЯІ у практично здорових людей теж виявився вищим у чоловіків, аніж у жінок, що може вказувати на узгодженість у кожній статі між першим та другим етапами реалізації спадкової інформації. У хворих на ГН порівняно з практично здоровими особами виявлено статистично значуще підвищення ЯІ у чоловіків від II-ї ($p < 0,01$), а в жінок – від III-ї стадій і вище ($p < 0,05$), причому в перших більш виражене. Вагома різниця між статтями за вказаним індексом відзначалася з II по IV стадії. Оскільки у хворих чоловіків спостерігалось гальмування деконденсації хроматину, то компенсаторно для забезпечення необхідної для клітини кількості білка активувалися трансляційні процеси.

Водночас доведено зниження індексу СХ у жінок і його підвищення у чоловіків, що може зумовлювати порушення контролю експресії генів на основі пригнічення регуляторних сайтів Х-хромосоми в обстежених пацієнтів обох статей у III-V стадіях ($p < 0,05$).

**Цитологічні показники нейтрофільних гранулоцитів крові
у хворих на ГН з різними стадіями ХХН, Me (25%; 75%)**

Стадії хронічної хвороби нирок		Індекси			
		хроматизації, ум.од.	ядерцевий, %	статевого хроматину, %	морфологічно змінених ядер, %
I стадія	обидві статі (n=16)	1,16 (0,78; 1,38)	6,79 (6,18; 7,86)	–	15,26 (11,93; 19,82) ***
	чоловіки (n=8)	1,27 (0,72; 1,40)	6,79 (6,22; 8,34)	7,35 (4,85; 9,06)	13,19 (10,16; 17,16) **
	жінки (n=8)	1,12 (0,93; 1,35)	6,67 (6,02; 7,36)	26,37 (22,62; 36,18) ###	19,26 (13,39; 24,49) ***
II стадія	обидві статі (n=16)	1,06 (0,83; 1,29)	7,78 (7,29; 9,45) **	–	20,44 (13,54; 23,30) ***
	чоловіки (n=8)	1,01 (0,77; 1,29)	9,15 (8,00; 10,30) **	8,01 (5,41; 12,45)	22,02 (20,44; 23,30) ***
	жінки (n=8)	1,06 (0,89; 1,28)	7,29 (6,81; 7,53) #	25,53 (23,47; 28,87) ###	14,21 (10,66; 24,05) **
III стадія	обидві статі (n=15)	1,08 (0,67; 1,16)	11,08 (8,49; 12,63) ***	–	37,05 (28,47; 44,76) ***
	чоловіки (n=8)	0,88 (0,59; 1,16)	12,30 (11,16; 12,68) ***	15,80 (7,58; 23,64) **	38,28 (31,54; 45,34) ***
	жінки (n=7)	1,08 (0,71; 1,21)	8,49 (7,30; 11,08) * #	19,75 (13,58; 23,87) *	33,58 (25,67; 44,76) ***
IV стадія	обидві статі (n=14)	0,91 (0,81; 1,08)	12,09 (11,26; 13,70) ***	–	44,38 (31,27; 48,77) ***
	чоловіки (n=7)	0,86 (0,62; 1,07) *	13,70 (12,09; 14,65) ***	17,07 (6,83; 27,26) *	42,84 (29,62; 46,81) ***
	жінки (n=7)	1,07 (0,82; 1,24)	11,26 (8,32; 12,09) ** #	17,94 (16,37; 21,68) *	48,64 (31,27; 51,08) ***
V стадія	обидві статі (n=14)	0,79 (0,69; 0,89) **	12,97 (12,73; 13,41) ***	–	43,85 (37,53; 51,37) ***
	чоловіки (n=7)	0,69 (0,46; 0,81) **	13,36 (12,82; 15,38) ***	16,83 (15,02; 18,81) ***	45,94 (37,53; 51,37) ***
	жінки (n=7)	0,89 (0,76; 0,97) #	12,83 (12,38; 13,08) ***	17,63 (12,98; 22,93) *	39,68 (37,51; 51,38) ***
Практично здорові	обидві статі (n=30)	1,17 (0,88; 1,29)	5,83 (4,12; 8,26)	–	8,37 (4,15; 10,07)
	чоловіки (n=15)	1,23 (0,89; 1,37)	7,08 (4,05; 8,26)	6,26 (4,29; 7,97)	8,45 (3,85; 9,86)
	жінки (n=15)	1,02 (0,81; 1,27)	5,49 (4,12; 8,43)	37,28 (25,64; 41,29)	8,29 (4,28; 11,72)

Примітки: 1. Статистична значущість відмінностей показників згідно зі статтю 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 кожній групі хворих на ХХН: # $p < 0,05$; # $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Реалізація біологічної інформації залежить і від цілісності каріолеми, наявності внутрішньоядерних везикул, тобто від морфологічних змін компонентів ядра. Індекс МЗЯ статистично значуще підвищувався у пацієнтів обох статей у всіх стадіях порівняно з практично здоровими особами, що в результаті змінювало конденсацію хроматину та процеси транскрипції, причому вираженіше у міру прогресування захворювання. Водночас за цим індексом вірогідної різниці між різними статями не спостерігалось в жодній стадії ХХН.

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

Статистично суттєві зміни ІХ зафіксовано лише у хворих чоловіків із супутньою СН ($p < 0,05$),

причому порівняно зі здоровими особами та з хворими чоловіками без СН. Значущою виявилася і різниця між статями у групі хворих із СН ($p < 0,05$). Встановлені зміни ІХ пов'язані з більш тяжким станом хворих у зв'язку з супутньою СН.

У хворих обох груп відзначалося статистично вагоме підвищення ЯІ, причому суттєвіше без супутньої патології. Це свідчить про певне виснаження компенсаторної активації біосинтетичних процесів у пацієнтів із СН. Значуща різниця між групами спостерігалася тільки у чоловіків ($p < 0,05$).

Індекс СХ статистично вагомо відрізнявся від такого практично здорових людей у пацієнтів обох статей лише при супутній СН. Водночас значущу різницю було відзначено при порівнянні статей у різних групах ($p < 0,01$).

Цитологічні показники нейтрофільних гранулоцитів крові
у пацієнтів із та без СН, Me (25 %; 75 %)

Групи дослідження		Індекси			
		хроматизації, ум.од.	ядерцевий, %	статевого хроматину, %	морфологічно змінених ядер, %
Практично здорові	обидві статі (n=30)	1,17 (0,88; 1,29)	5,83 (4,12; 8,26)	—	8,37 (4,15; 10,07)
	чоловіки (n=15)	1,23 (0,89; 1,37)	7,08 (4,05; 8,26)	6,26 (4,29; 7,97)	8,45 (3,85; 9,86)
	жінки (n=15)	1,02 (0,81; 1,27)	5,49 (4,12; 8,43)	37,28 (25,64; 41,29)	8,29 (4,28; 11,72)
І група	обидві статі (n=40)	1,08 (0,74; 1,25)	11,88 (7,99; 12,97) ***	—	22,41 (15,59; 32,69) ***
	чоловіки (n=21)	1,07 (0,71; 1,17)	12,63 (11,23; 13,61) ***	7,62 (5,67; 15,02)	22,18 (15,81; 31,80) ***
	жінки (n=19)	1,15 (0,82; 1,30)	11,08 (7,25; 12,73) ** #	24,61 (21,68; 30,27) ###	24,25 (15,37; 33,58) ***
II група	обидві статі (n=35)	0,89 (0,64; 1,12) ** @	8,61 (6,67; 11,88) *** @@	—	38,92 (28,47; 45,94) *** @@
	чоловіки (n=17)	0,67 (0,53; 0,89) * @	9,55 (7,91; 11,97) ** @	17,71 (10,05; 24,95) *** @@	39,65 (29,62; 46,81) *** @@
	жінки (n=18)	0,96 (0,83; 1,12) #	7,80 (6,58; 11,26) *	19,81 (13,58; 23,16) ** @@	38,22 (25,67; 44,76) ***

Примітки: 1. Статистична значущість відмінностей показників згідно зі статтю 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: # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001.

3. Статистична значущість відмінностей показників згідно зі статтю у групах хворих із та без СН: @ p<0,05; @@ p<0,01.

Суттєвіше підвищення індексу МЗЯ зафіксовано у пацієнтів із супутньою СН, що зумовлено вираженішими порушеннями організму внаслідок асоціації двох патологій. При порівнянні двох груп вагомі зміни спостерігалися лише у чоловіків (p<0,01), що вказує на кращі компенсаторні можливості організму в жінок.

ВИСНОВКИ

1. Проведеним порівняльним аналізом цитогенетичних характеристик нейтрофільних гранулоцитів у крові хворих на ГН із різними стадіями ХХН та при наявності супутньої СН або без неї виявлено порушення усіх показників транскрип-

ційно-трансляційного апарату. Більш вираженими виявилися зміни функціонального стану нейтрофільних гранулоцитів у пацієнтів із пізніми стадіями ХХН та при наявності супутньої СН, причому частіше у хворих чоловічої статі.

2. Перспективи подальших досліджень полягатимуть у пошуку нових лікарських засобів, які могли б позитивно впливати на змінений функціональний стан нейтрофільних гранулоцитів у хворих на ГН, та на основі вже отриманих базових показників оцінювати ефективність їх лікування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Гвоздев В.А. Гетерохроматин и его функциональные характеристики / В.А. Гвоздев, Л.А. Усакін, Р.Л. Коган // Мед. генетика. – 2003. – Т. 2, № 7. – С. 290–296.
- Кардіоваскулярні ускладнення у хворих на хронічну хворобу нирок / М. О. Колесник [та ін.]. – К.: Поліграф плюс, 2010. – 224 с.
- Рационалізаторська пропозиція № 30/2319. Виявлення ДНК в цитологічних препаратах / Л.Є. Ковальчук, Н.В. Ковальчук, В.І. Ілік. – Івано-Франківськ, 1997.
- Berbari A.E. Cardiorenal Syndrome: Mechanisms, Risk and Treatment / A. E. Berbari, G. Mancina. – Milan: Springer-Verlag, 2010. – 396 s.
- Chan E. J. Cardiorenal Syndrome: The Clinical Cardiologists' Perspective / E. J. Chan, K. C. Dellsperger // Cardiorenal Med. – 2011. – N 1. – P. 13–22.
- Genetic Association Studies: Discovery of the Genetic Basis of Renal Disease / M. Verduijn [et al.] // Nephron Clin. Pract. – 2011. – Vol. 119. – P. 236–239.
- Mayadas T. N. Neutrophils: game changers in glomerulonephritis? / T.N. Mayadas, F. Rosetti, T. Hernandez // Trends Molecular Medicine. – 2010. – Vol. 16, N 8. – P. 368–378.
- Prenatal Programming and Epigenetics in the Genesis of the Cardiorenal Syndrome / R. Nistala [et al.] // Cardiorenal Med. – 2011. – N 1. – P. 243–254.
- The complexity of the cardio-renal link: taxonomy, syndromes, and diseases / C. Zoccali [et al.] // Kidney Inter. Supplements. – 2011. – N 1. – P. 2–5.