

## **Цитохимический анализ лимфоцитов периферической крови у детей с хроническим гломерулонефритом в условиях различных схем кортикостероидной терапии**

*Комарова О. В., Сергеева Т. В., Шищенко В. М.*

*Научный центр здоровья детей РАМН, Москва*

*Адрес для переписки: 117963, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 2/62, Научный центр здоровья детей РАМН, отделение нефрологии*

*Телефон: (095) 134-04-49. Комарова Ольга Викторовна*

Ключевые слова: гломерулонефрит, преднизолон, сукцинат дегидрогеназа

### **Абстракт.**

**В настоящей работе проводится анализ изменений активности митохондриального фермента сукцинат дегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах периферической крови у больных с хроническим гломерулонефритом. В работе показано, что активная иммуносупрессивная терапия влияет на ферментный статус лимфоцитов. Изменение активности СДГ зависит от пути введения и дозы кортикостероидов**

**The aim of the study was to investigate the effect of corticosteroids (Cs) on the mitochondrial succinate dehydrogenase activity (MSDGA) of peripheral blood lymphocytes in patients with glomerulonephritis. MSDGA was evaluated by a quantitative cytochemical method in three groups of patients. The first group was treated with Cs pulses, and the second with oral Cs. Patients in the third group went into remission and were therefore not treated. The results of the study confirmed the effect of Cs on the enzyme status of peripheral blood lymphocytes. The changes of MSDGA evaluated in the beginning of therapy correlated with treatment protocol. They were maximal after Cs pulses (1st group) and significantly lower in patients who received oral Cs (2nd group). In the third group, MSDGA was normal. A relationship was found between the changes in MSDGA after the first Cs pulse and the reduction of proteinuria by the seventh day of treatment.**

Хронический гломерулонефрит (ХГН) - одна из наиболее тяжело протекающих патологий почек, требующая длительной иммуносупрессивной терапии [7]. Терапия, в свою очередь, имеет ряд побочных действий, которые могут ухудшать течение и исход гломерулонефрита [5]. В связи с этим крайне важно изучение положительных и отрицательных сторон влияния патогенетической терапии на организм больного. Клетка, как наиболее низкий уровень организации организма, в первую очередь отражает те изменения, которые впоследствии можно будет увидеть на макроуровне [2]. Изучение строения и функционирования клетки способствует лучшему пониманию процессов, происходящих в организме больного в ходе течения хронического гломерулонефрита, а также в ответ на столь сильный фактор, как иммуносупрессивная терапия.

Цитохимический анализ является высокоинформативным и относительно доступным методом изучения клетки. В основе данного исследования лежит изучение ферментного статуса лейкоцитов, в частности лимфоцитов [4]. Лимфоцит, являясь иммунокомпетентной клеткой, осуществляет множество разнообразных функций. Это становится возможным благодаря высокой активности в нем метаболических процессов, обеспечивающих клетку энергией и пластическим материалом. Основной фермент из группы дегидрогеназ - сукцинат дегидрогеназа (СДГ), которая локализуется в митохондриях и наряду с альфа-глицерофосфат дегидрогеназой и кислой фосфатазой наиболее активно участвует в энергетическом обмене клетки [8].

В последние годы появились работы, подтверждающие первостепенную роль изменений энергетического обмена в митохондриях в развитии апоптоза - запрограммированной смерти клеток [6]. В настоящее время доказано, что апоптоз, являясь механизмом регуляции клеточной популяции, играет одну из ведущих ролей в патогенезе многих заболеваний, в том числе и хронического гломерулонефрита [10].

Существуют литературные данные, доказывающие тесную взаимосвязь ферментного статуса лимфоцитов с активностью митохондриальных дегидрогеназ, в частности СДГ, в активно функционирующих органах, в первую очередь почках [1]. В ряде исследований показана тесная связь между активностью СДГ в лимфоцитах и течением ХГН [3]. Однако сведений о влиянии различных схем иммуносупрессивной терапии на ферментативную активность лимфоцитов при данной патологии нет.

Цель настоящей работы - изучить влияние кортикостероидной терапии гломерулонефрита на ферментный статус лимфоцитов.

## Материалы и методы

Обследовано 19 детей в возрасте от 6 до 13 лет с ХГН, у 12 из них выявлена смешанная форма ХГН (нефротический синдром с гематурией и с гипертонией), у 7 больных - нефротическая форма ХГН. У всех детей на момент исследования сохранялась активность заболевания. Больные обследованы в функционально компенсированную стадию заболевания.

Дети с активной стадией заболевания получали глюкокортикоидную терапию. 10 детям (1-я группа) проводилась инфузионная терапия метилпреднизолоном в сверхвысоких дозах - 30 мг/кг (максимально 1000 мг на инфузию). Курс лечения составлял в среднем 5-7 инфузий через день в течение 10-14 дней (минимально 3 и максимально 12 в/в введений). Цитохимический анализ проводился до начала пульс-терапии, через 7-10 дней и после ее завершения, 9 детей (2-я группа) получали преднизолон перорально в стандартной дозе 2 мг/кг в течение 4-6 недель с последующим переходом на поддерживающую дозу преднизолона в альтернирующем режиме. Во 2-й группе обследованных детей цитохимический анализ проводился однократно на 2-3-й неделе приема терапевтической дозы преднизолона.

Для оценки первого ответа на введение сверхвысоких доз стероидов и определения соответствия ранних изменений активности СДГ динамике клинико-лабораторных показателей ХГН в 1-й группе обследованных детей была выполнена 40-минутная экспертиза - проведен цитохимический анализ лимфоцитов крови до и через 40 минут после введения 1-й дозы метилпреднизолона. Всего проведено 54 цитохимических исследования.

Определение активности СДГ проводили количественным цитохимическим методом, который позволил дать оценку ферментному профилю лимфоцитов по 5 основным показателям [4]:

1. Показатель Q отражает среднюю активность фермента; в норме средняя активность СДГ - 18,7-19,9 гр/лимф.

2. Показатель E - коэффициент эксцесса - характеризует избыток ( $E > 0$ ) или недостаток ( $E < 0$ ) клеток с околосредней (типичной) активностью, т. е. тех клеток, которые в ответ на внешнее воздействие активизируются, увеличивая тем самым интенсивность обмена в клетке. Нормальное количество клеток с типичной активностью фермента наблюдается при коэффициенте эксцесса, близком к 0.

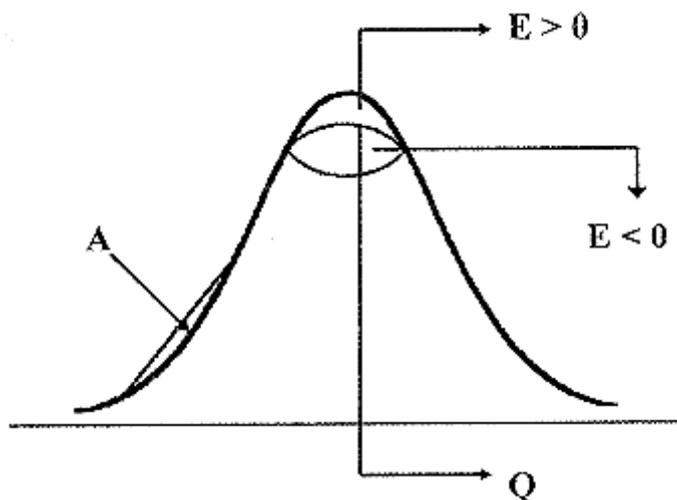
3. Коэффициент асимметрии A характеризует соотношение пулов клеток с низкой (левая часть графика) и высокой (правая часть графика) активностью энзима. В норме сохраняется баланс этих пулов, значение коэффициента асимметрии равно 0. Увеличение A свидетельствует об увеличении клеток с низкой активностью фермента, т. е. функционально некомпетентных.

4. Относительная энтропия информации H отражает разнообразие клеток по активности фермента.

5. Коэффициент вариации V характеризует разнородность клеток по ферментативной активности

В нашей работе были использованы три основные характеристики (средняя активность, коэффициент асимметрии и эксцесса) ферментного профиля лимфоцитов (рис. 1).

### Рис. 1. Распределение показателей ферментного профиля лимфоцитов



Параллельно с изучением ферментной активности клетки в условиях терапии глюкокортикоидами с помощью анализатора изображения клетки "Диаморф" были исследованы изменения, происходящие на субклеточном уровне в митохондриях. В анализаторе изображения происходит постепенное выделение очагов наибольшей ферментативной активности в митохондриях, определяемое по усилению оптической плотности гранул продукта реакции.

### Результаты исследования и обсуждение

В 1-й группе детей при изучении ферментного профиля лимфоцитов до, во время и по окончании пульс-терапии метилпреднизолоном были выявлены незначительные колебания средней активности СДГ:  $17,25 \pm 1,27$ ,  $17,55 \pm 1,5$  и  $17,56 \pm 1,26$  гр/лимф. соответственно. В то же время происходило изменение в структуре популяции лимфоцитов. Отмечено достоверное снижение коэффициента асимметрии по окончании терапии с  $0,45 \pm 0,1$  до  $0,24 \pm 0,1$ , что свидетельствует о том, что в ходе терапии сверхвысокими дозами стероидов происходит постепенная нормализация баланса клеток с высокой и низкой активностью.

При исследовании коэффициента эксцесса в этой группе детей во время проведения пульс-терапии выявлена тенденция к его увеличению с  $-0,29 \pm 0,2$  до  $0,16 \pm 0,4$ , а по окончании терапии выявлено резкое понижение коэффициента эксцесса в среднем до  $-0,66 \pm 0,09$ . При этом у 6 детей выявлено значительное снижение коэффициента  $E$  от начала терапии к ее завершению, в то время как у 3 больных с исходно сниженным коэффициентом отмечено его повышение до нормальных значений. В одном наблюдении коэффициент эксцесса оставался в пределах нормы на протяжении терапии. Выявленная динамика свидетельствует о том, что в процессе проведения терапии сверхвысокими дозами стероидов происходит увеличение количества клеток с типичной активностью, т. е. тех клеток, которые в ответ на лекарственное воздействие активизируются, тем самым увеличивая процессы обмена в клетке. Уменьшение числа клеток с типичной активностью по окончании пульс-терапии свидетельствует об истощении резерва активно функционирующих клеток в ответ на столь сильный стимул.

Таким образом, проведенный цитохимический анализ позволил выявить влияние проводимой терапии сверхвысокими дозами метилпреднизолона на клетку.

Проведение 40-минутной экспертизы в 1-й группе позволило определить ранние цитохимические изменения лимфоцитов после введения первой дозы метилпреднизолона, а также соотнести их с последующей динамикой протеинурии в течение 7 дней. У 4 больных повышение средней активности СДГ с  $19,63 \pm 1,3$  до  $22,38 \pm 0,92$  ( $p < 0,05$ ) соответствовали уменьшению протеинурии с  $2,8$  г/сут до  $0,87$  г/сут через 7 дней от начала лечения. Коэффициент асимметрии у этих детей был выше нормальных значений ( $0,5 \pm 0,2$  и  $0,59 \pm 0,28$  соответственно), что свидетельствует в пользу того, что стероиды в максимальной дозе являются очень сильным фактором воздействия на клетку и в первый момент усугубляют имеющийся дисбаланс клеток с низкой и высокой активностью. У 6 больных снижение средней активности с  $16,3 \pm 1,8$  до  $13,3 \pm 2,0$  ( $p < 0,01$ ), отсутствие изменения коэффициента асимметрии соответствовали отсутствию сдвигов в суточной экскреции белка через 7 дней ( $3,1$  г/сут и  $3,6$  г/сут соответственно). Коэффициент эксцесса у всех детей 1-й группы несколько вырос в ходе 40-минутной экспертизы с  $-0,4 \pm 0,35$  до  $0,06 \pm 0,2$

у 4 детей с положительной динамикой в клинической картине и с  $-0,5 \pm 0,3$  до  $0,045 \pm 0,6$  у детей с отрицательной динамикой. Выявленные изменения укладываются в нормы колебаний данного коэффициента. В то же время намеченная тенденция свидетельствует о том, что первое введение супермаксимальной дозы стероидов вызывает активацию лимфоцитов с типичной активностью. Полученные результаты позволяют использовать 40-минутную цитохимическую экспертизу в ранней оценке прогноза эффективности стероидной терапии.

При сравнении цитохимических показателей лимфоцитов во 2-й и 3-й группах можно выявить следующие закономерности: средняя активность СДГ у детей, получавших преднизолон в дозе 2 мг/кг, несколько ниже нормы и в среднем равна  $16,9 \pm 1,04$  гр/лимф., а у больных ХГН в периоде ремиссии, при отсутствии патогенетической терапии, средняя активность фермента соответствовала норме:  $18,9 \pm 0,6$  гр/лимф. Коэффициент асимметрии во 2-й и 3-й группах детей значительно не отличался и в среднем был равен  $0,41 \pm 0,17$  и  $0,47 \pm 0,17$  соответственно. Коэффициент эксцесса у детей во время лечения преднизолоном *per os* остается в пределах нормы  $0,15 \pm 0,63$ , а в периоде ремиссии этот показатель несколько снижен, хотя также укладывается в нормальные границы колебаний:  $-0,15 \pm 0,38$ . Сравнивая средние показатели коэффициентов эксцесса, асимметрии и средней активности СДГ в 1-й и 2-й группах, мы видим лишь значительное ( $p < 0,05$ ) различие между коэффициентом E:  $-0,66 \pm 0,09$  и  $-0,03 \pm 0,34$ . Большее истощение резерва клеток с типичной активностью СДГ после пульс-терапии, чем в условиях приема терапевтической дозы преднизолона, характеризует более выраженный супрессивный эффект супермаксимальных доз стероидов, который заключается в выраженном подавлении синтеза комплемента, стабилизации лизосомальных мембран, торможении высвобождения цитокинов и др. [9].

Применение анализатора изображения клеток позволило выявить изменения митохондрий во время терапии стероидами: в 1-й группе детей при проведении инфузионной терапии сверхвысокими дозами метилпреднизолона отмечено резкое активирование всех митохондрий с последующим их быстрым истощением, в то время как влияние перорального приема преднизолона (2-я группа детей) оказалось более мягким и приводило к умеренной активации части митохондрий. Выявленные изменения свидетельствуют о различиях в механизмах действия в зависимости от дозы препарата и способа ее введения.

Таким образом, в работе выявлено влияние кортикостероидной терапии на ферментный статус лимфоцитов. Было установлено, что наиболее сильное влияние на изменение активности СДГ оказывает пульс-терапия сверхвысокими дозами стероидов, что подтверждает более выраженный супрессивный эффект максимальных доз стероидов.

С помощью 40-минутной цитохимической экспертизы были выявлены первые цитохимические сдвиги в лимфоцитах крови при проведении пульс-терапии. При сопоставлении выявленных ранних изменений активности СДГ и динамики протеинурии через 7 дней от начала данного лечения были установлены определенные соответствия этих показателей.

Изучение изменений, происходящих на субклеточном уровне в митохондриях во время проведения иммуносупрессивной терапии, подтверждает различия в механизмах действия стандартных и сверхвысоких доз стероидов.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что цитохимический анализ лимфоцитов крови может служить для оценки влияния глюкокортикоидов на организм больного с ХГН, а также может быть использован для прогноза эффективности иммуносупрессивной терапии.

## **Выводы**

1. Проводимая стероидная терапия ХГН влияет на ферментный профиль лимфоцитов крови.
2. Преднизолон, введенный в супермаксимальной дозе, обладает более выраженным эффектом на активность СДГ, чем при пероральной терапии в стандартной дозе.
3. 40-минутная экспертиза определяет первые изменения активности фермента в лимфоцитах в ответ на введение первой дозы стероидов. Начальные цитохимические сдвиги в лимфоцитах соответствуют динамике протеинурии у больных хроническим гломерулонефритом. Повышение активности СДГ и коэффициента асимметрии лимфоцитов в ответ на однократное внутривенное введение преднизолона прогностически благоприятно в отношении ответа на терапию.

4. Изменения в митохондриях лимфоцитов во время проведения преднизолонотерапии сопровождаются изменениями показателей ферментного профиля лимфоцитов.

### Список литературы:

1. Атаханов Ш.Э., Духова З.Н., Катосова Л.К. и др. Корреляция активности дегидрогеназ лимфоцитов и внутренних органов. Медицинский журнал Узбекистана, 1982; №5: 63-68.
2. Катосова Р.К., Шищенко В.М., Нарциссов Р.П. Лимфоцит, лимфоцитарные органы и иммунитет. В сб.: Материалы конференции НИИ педиатрии АМН СССР. Москва, 1973; с.9-12.
3. Логвинова И.И. Цитохимические исследования лимфоцитов крови при гломерулонефрите у детей. Педиатрия, 1973; №3:65.
4. Нарциссов Р.П. Цитохимия ферментов лейкоцитов в педиатрии. Автореф. дисс. докт. 1970. Москва; 37 с.
5. Fridman A.D., Chesney R.W. Glucocorticoids in renal disease. *Am J Nephrol* 1982; 2: 330-341.
6. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
7. Haycock G.B. The treatment of glomerulonephritis in children. *Pediatr Nephrol* 1988; №2: 247-255.
8. Niaudet P., Rotig F. The kidney in mitochondrial cytopathies. *Kidney Intern* 1997; 51: 1000-1007.
9. Ponticelli C., Fogazzi G.B. Methylprednisolone pulse therapy for primary glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 1989; N 9: 41-46.
10. Savill J., Mooney A., Hughes J. What role does apoptosis play in progression of kidney disease. *Current opinion in nephrol and hypert* 1996; 5:369-374.