© И.А.Ракитянская, 1998
УДК 616.611-002-036.12-085:615.015.5:612.112.94

И.А. Ракитянская

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ К СТЕРОИДАМ И ИММУНОДЕПРЕССАНТАМ

I.A. Rakityanskaya

SENSIBILLTY AND RESISTANCE OF THE PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES TO STEROIDS AND IMMUNODEPRESSANTS IN PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

Научно- исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

Ключевые слова: гломерулонефрит, лечение, стероиды, иммунодепрессанты, механизмы действия.
Key words: glomerulonephritis, treatment, steroids, immunodepressants, mechanisms of actions.

До настоящего времени нет единой точки зрения по вопросу механизма действия патогенетических препаратов, получения эффекта или отсутствие его у больных хроническим гломерулонефритом (ХГН). Развивающаяся резистентность к препаратам практически не зависит от морфологической формы ХГН и может иметь первичную или вторичную природу, т. е. по какой-то причине лекарственный препарат не реализовывает свое фармакологическое действие. Известно, что достигаемый положительный эффект от введения глюкокортикостероидов (ГКС) и цитостатиков (ЦС) непостоянен у одних и тех же больных и нередко препарат, дающий эффект в дебюте заболевания, при последующих обострениях оказывается неэффективным. Развитие резистентности больных к патогенетической терапии во многом определяет прогноз заболевания.

Существует понятие множественной лекарственной резистентности (МЛР), которая может быть исходной и индуцированной, т. е. возникающей в процессе проведения курсов терапии.

В 1960—1970 гг. всестороннее исследование ГКС как универсальных биорегуляторов дало возможность сформулировать положение о существование специфических ГКС-рецепторов, которые имеются практически во всех тканях. Рецепторы к ГКС генетически детерминированы и являются цитозольными белками. Их особенность заключается в высоком сродстве к ГКС, ограниченной насыщаемости и большой специфичности. Цитозольные и мембранные рецепторы к ГКС существенно различаются как аффинностью к гормонам, так и концентрацией мест связывания. Внутриклеточные рецепторы характеризуются высоким сродством и значительно меньшим числом связывающих участков. Также эти рецепторные системы различаются по способности связывать природные и синтетические стероиды (для синтетических — характерна избирательность связывания с внутриклеточным рецептором, тропность природных ГКС к внутриклеточным рецепторам проявляется в значительно меньшей степени). Причем, все эти особенности характерны для любого вида клеток. Природный глюкокортикоид в физиологических концентрациях преимущественно связан с мембранными рецепторами, а для насыщения и мембранных и цитозольных рецепторов необходимо повышение его концентрации в 140 раз.

Таким образом, мембранные рецепторы играют модулирующую роль, подготавливая клетку к восприятию сигнала, а далее запускается каскад последовательных биохимических реакций, которые приводят к реализации биологического эффекта гормона, но конкретно его достижение возможно только посредством взаимодействия ГКС с цитозольным рецептором. Возможно проникновение в клетки свободной части (не связанной с транспортными белками) ГКС путем простой диффузии с дальнейшим взаимодействием с цитозольным рецептором. Образовавшийся гормонрецепторный комплекс активируется, транслоцируется в ядро, инициирует экспрессию клеточного генома, что в конечном счете приводит к синтезу специфических белков, определяющих биологический ответ клетки на гормональный сигнал [5—7].

В 70-х годах в эксперименте было показано наличие существования двух субпопуляций ти-

моцитов, различающихся своей чувствительностью к стероидам: глюкокортикоидрезистентные и глюкокортикоид-чувствительные. Эти субпопуляции различаются по степени зрелости, характеристикой поверхностных антигенов, электрофоретической подвижностью, плавучей плотностью, реакцией на митогены. К резистентным клеткам относятся зрелые иммунокомпетентные лимфоциты, которые способны отвечать на стимуляцию митогена ФГА, обладают высокой плотностью Н2-антигена и низкой плотностью θ-антигена. Гормончувствительные тимоциты — это незрелые неиммунокомпетентные лимфоциты, обладающие высокой плотностью θ- и Lyt-2,3-антигенов [11].

При исследовании влияния стероидных гормонов на лимфоидные клетки показано ингибирующее действие на транспорт глюкозы, образование АТФ, транспорт аминокислот, синтез холестерина, липидов, белков, нуклеиновых кислот, активность ДНК-зависимых РНК-полимераз. Все это приводит к подавлению роста гормончувствительных лимфоидных элементов. Выявлено существенное различие в количестве зон сильного ассоциирования, что обуславливает особенности взаимодействия ГКС с акцепторами гормонрезистентных лимфоцитов, т. е. имеется различие в состоянии хроматина, который различается по своей чувствительности и степени зрелости, так как процесс клеточной дифференцировки сопровождается качественными и количественными изменениями в составе белков хроматина. Также принципиально различаются распределения гормонрецепторных комплексов в лимфоцитах, следовательно, чувствительность лимфоидных клеток определяется неодинаковым взаимодействием с ядерными акцепторами клеток. Получены данные о наличии специфических мест связывания стероидных гормонов на плазматических мембранах клеток-мишеней [7].

Работ, посвященных проблеме развития резистентности к стероидным препаратам у больных хроническим гломерулонефритом, мало. Первоначально хотелось бы обратить внимание на тот факт, что чувствительными лимфоцитами являются лимфоидные элементы раннего этапа дифференцировки. Кортизончувствительная фракция лимфоцитов представлена в основном лимфоцитами, несущими маркерный фермент — терминальную дезоксинуклеотидилтрансферазу (ТдТ+-клетки) [12]. Как показано в наших работах ранее [1—4], именно эти клетки вырабатываются в недостаточном количестве у больных с ХГН, причем дефицит продукции этих элементов нарастает по мере прогрессирования заболевания. Отсюда следует, что механизм дефицита в системе лимфопоэза может быть одной из причин развития резистентности к терапии стероидами (рис. 1). Также не исключена вероятность того, что дефект системы лимфопоэза генетически предетерминирован. Показано, что представительство ГКС-рецепторов на мембране лимфоцитов генетически предетерминировано. HLA-генотип гормончувствительных больных с ХГН представлен преимущественно A1A2A3A24, а гормонрезистентных больных — A10A19A30B14B16B40.

При морфологической оценке мононуклеаров периферической крови методом электронной микроскопии у гормонрезистентных больных с ХГН выявлены три типа клеток:

I тип лимфоцитов — высокое ядерно-цитоплазматическое отношение с большим активным ядрышком, свидетельствующее об усиленном синтезе РНК;

II тип — гетерогенность хелперной фракции и снижение ее содержания;

III тип — большие гранулосодержащие лимфоциты, имеющие в ядре гетерохроматин, что свидетельствует о снижении их активности.

У больных с чувствительностью к стероидам выявлены в крови лимфоциты:

I тип — менее активное ядрышко;

II тип — ядро с глубокими инвагинациями и более активным ядрышком;

III тип — большие гранулосодержащие лимфоциты, более функционально полноценные.

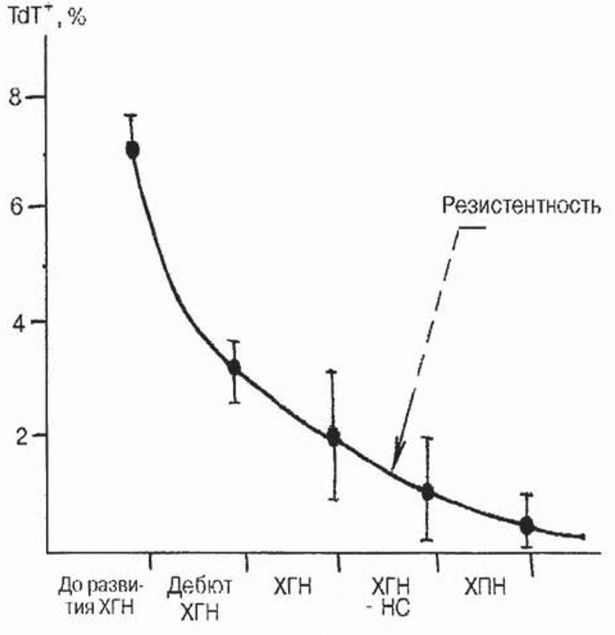

Рис. 1. Механизм развития резистентности лимфоцитов к стероидам на фоне уменьшения TdT+-лимфоцитов в костном мозге и в периферическом русле.

Также был выявлен тип лимфоцитов, у которых ядерная мембрана имеет глубокие инвагинации, что увеличивает поверхность ядра и повышает его активность.

Показано, что по мере развития резистентности снижается функциональная активность лимфоцитов в реакции бласттрансформации (РБТЛ) (рис. 2), что также зависит от содержания в периферической крови ранних лимфоидных элементов (в частности, ТдТ+-клеток) [1]. Таким образом, по морфологическим критериям можно сказать, что лимфоциты больных с резистентностью к ГКС обладают хорошо развитым РНК-синтезирующим аппаратом, гиперреактивностью ядрышкового аппарата и значительным увеличением общей концентрации ферментов, т. е. лимфоциты у резистентных больных имеют морфофункциональные особенности, которые ограничивают эффективность терапевтических доз кортикостероидов.

Резистентность бывает первичной и вторичной. Вторичная резистентность может быть обусловлена недостаточностью ГКС-рецепторов, часть которых либо ингибированы, либо заняты конкретными веществами. Примером может служить развитие резистентности у больных на фоне гиперлипидемии. ГКС-гормоны обладают способностью ингибировать синтез холестерина в клетках периферической крови. У больных с гиперхолестеринемией лимфоциты крови содержат пониженное количество рецепторов и обладают пониженной чувствительностью к ГКС. При нормализации уровня холестерина крови наблюдается восстановление необходимого количества рецепторов на лимфоцитах. Вероятно, эффект от ГКС-терапии, который можно получить после проведения плазмафереза, и обусловлен феноменом очищения мембранных рецепторов лимфоцитов. Однако этот эффект очищения рецепторов очень непродолжителен по времени.

По мере прогрессирования заболевания происходит селекция и увеличение удельного веса тех клонов клеток, которые исходно отличаются от доминирующей субпопуляции по химиочувствительности. Точкой приложения ГКС является индуктивная фаза жизнедеятельности клеток, рецепторы появляются, а затем численно увеличиваются в 2—3 раза в S- и пост S-фазах по сравнению с фазами Go и G1. Синтез новых рецепторов на мембране лимфоцитов является одним из главных феноменов пролиферации клеток. В дальнейшем через эти рецепторы осуществляется нейроэндокринная регуляция иммунных процессов. Точкой приложения глюкокортикостероидов является индуктивная фаза активации Т-лимфоцитов. Глюкокортикостероиды, действуя на антигенпредставляющие клетки, блокируют процесс иммунного распознавания, подавляют продукцию интерлейкинов (ИЛ-1) и последующие клеточные взаимодействия, ведущие к выработке ИЛ-2, задерживают дифференцировку моноцитов в макрофаги.

При изучении состава лимфоидной инфильтрации у стероидчувствительных больных мембранозным гломерулонефритом было выявлено высокое содержание СД4-хелперов, СД8-супрессоров и моноцитов/макрофагов, как в гломерулярной зоне, так и в интерстициальном пространстве [8]. При этом показано, что иногда тубулярные клетки способны экспрессировать HLA-DR-антиген. Высокая степень корреляции между HLA-DR+-клетками и интерстициальными Т-лимфоцитами свидетельствует об активации. При этом нет взаимосвязи между количеством интрагломерулярных и интерстициальных клеток в зависимости от резистентности или чувствительности больных на стероидную терапию.

При стероидчувствительном гломерулонефрите с минимальными изменениями выявлены сдвиги в системе Т-звена и в продукции ИЛ-2, считается, что этот интерлейкин и экспрессия к нему рецепторов на клетках (СД25) являются важнейшими факторами в патогенезе стероидчувствительного ГН с минимальными изменениями [9]. Больные, не чувствительные к стероидам, но чувствительные к циклоспорину А, продуцировали минимальное количество ИЛ-2,

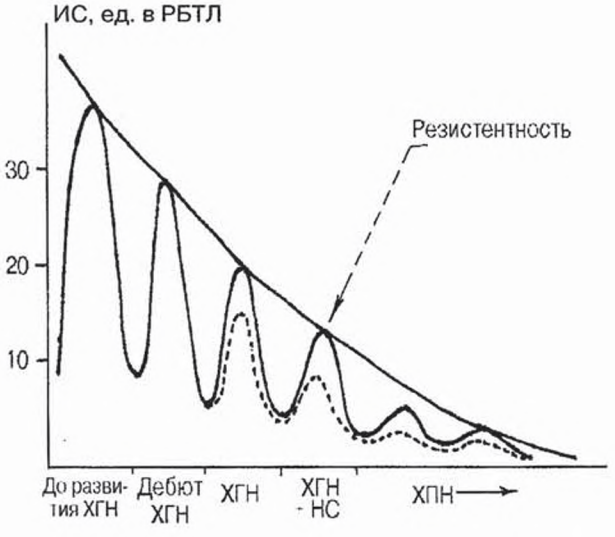

Рис. 2. Развитие резистентности лимфоцитов к стероидам по мере падения пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бласттрансформации при прогрессировании заболевания.

ИС — индекс стимуляции.

а соответственно и низкое содержание клеток СД25, хотя в культуре в супернатанте удается выявить высокое количество рецепторов к ИЛ-2 при дополнительной стимуляции [13].

Недавно было показано, что глюкокортикоиды, подавляя продукцию ИЛ-2 и экспрессию рецепторов для ИЛ-2, в то же время стимулируют продукцию ИЛ-4. Кроме того, ИЛ-4 является ингибитором экспрессии рецепторов для ИЛ-2 на В-лимфоцитах, что объясняет его синергичный эффект с глюкокортикостероидами.

Длительное применение глюкокортикоидов приводит к снижению размера и массы лимфоидной ткани, уменьшению синтеза В- и Т-лимфоцитов, их выходу из циркуляции, в результате чего наблюдается лимфоцитопения и моноцитопения. Снижается функция Т-лимфоцитов за счет торможения продукции ИЛ-2 и уменьшения экспрессии рецепторов для ИЛ-2. Функции В-лимфоцитов уменьшаются, а продуцируемые ими антитела неполноценны и плохо соединяются с клеточной поверхностью и факторами комплемента, в результате чего тормозится и становится неполноценной фагоцитарная функция. Снижается также сцепление антигена с клеточной поверхностью лимфоцита, наступает супрессия лимфоцитарной реакции.

Понятие МЛР имеет отношение и к цитостатическим препаратам. Эти вопросы достаточно хорошо изучены в онкологии. Клетки с фенотипом МЛР имеют перекрестную устойчивость к различным по механизму действия цитостатикам. Клетки с фенотипом МЛР имеют большое количество биохимических и молекулярно-генетических изменений. В 1991 г. в литературе были описаны 2 типа МЛР: классическая и атипическая.

Классическая МЛР характеризуется экспрессией на поверхности клетки гликопротеина Р-170 с относительной молекулярной массой 150—190 и экспрессией гена, кодирующего Р-170, а также уменьшением накопления ЦС в резистентных клетках по сравнению с чувствительными. При атипической МЛР Р-гликопротеин не экспрессируется, но это не значит, что отсутствие экспрессии этого белка является абсолютным показателем чувствительности клеток к ЦС. Известно, что после 3—5 курсов цитостатической терапии выявляется экспрессия Р-гликопротеина и развивается МЛР. Р-гликопротеин обладает АТФазной активностью, благодаря чему осуществляется АТФазный выброс ЦС из устойчивых клеток, приводя к уменьшению их накопления. Р-гликопротеин находится не только на поверхности цитоплазматической мембраны, но и на мембране комплекса Гольджи. Р-гликопротеин может экспрессироваться на клетках любого гистотипа, в том числе и в почках. При этом показано, что экспрессия его в лимфоцитах несколько ниже. В сыворотке здоровых людей присутствует низкомолекулярное ароматическое соединение, связывающееся с гликопротеином и, таким образом, отменяющее МЛР. Однако физиологическая роль этих соединений не ясна. Считается, что физиологическая роль Р-гликопротеина связана с транспортом веществ из клетки.

Развитие резистентности к цитостатикам связано с пониженным накоплением препарата в клетках за счет активного выброса во внеклеточную среду. Аналогично ЦС резистентные клетки имеют пониженное накопление красителей и быстрее их теряют, чем чувствительные. При этом в эксперименте показано, что краситель (Родамин 123) быстро выходит из 30% Т-хелперов и из 90% Т-киллеров, но гораздо медленнее из В-лимфоцитов.

Препараты иммуносупрессивного действия обладают общим свойством подавлять размножение клеток путем блокады или деструкции ядерной ДНК, в результате чего прерывается необходимая для клеточного деления ее репликация. Циклофосфан тормозит деление клеток путем алкилирования ДНК, в результате чего становится невозможной деспирализация и репликация ядерных нуклеопротеидов. Циклофосфан действует на все фазы клеточного цикла. Известно, что на проникновение ЦС в клетки влияет заряд их молекулы, в связи с чем изучаются ионные изменения клеток при патологии.

Эффект от ЦС зависит также от дозы и длительности приема препарата. Показано, что основная закономерность действия ЦС состоит в первоначальном усугублении дефицита недифференцированных лимфоидных предшественников в крови, а затем возникает гиперрегенерация костного мозга с увеличенным выходом в кровь ранних лимфоидных элементов [10]. При высокой дозе эффект гиперрегенерации менее вероятен, учитывая, что у больных с ХГН изначально заложен дефицит продукции ранних лимфоидных элементов.

Следовательно, при назначении патогенетической терапии необходимо определять наличие чувствительности лимфоцитов крови к препаратам, учитывая также возможность развития резистентности. Поэтому желательно проводить индивидуальный подбор лекарственных средств и по возможности проводить мероприятия, снимающие вероятность исходной резистентности [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Рябов С.И., Ракитянская И.А., Шутко А.Н., Шатинина Н.Н. Индекс стимуляции лимфоцитов периферической крови у больных хроническим гломерулонефритом // Клин. мед.—1986.—Т. 14, № 2.— С. 106—110.

2. Рябов С.И., Ракитянская И.А., Шутко А.И. Почки и иммунная система.—Л.: Наука, 1989.

3. Рябов С.И., Ракитянская И.А. Современные подходы к терапии больных хроническим гломерулонефритом // Нефрология.—1997.—Т. 1, № 1.—С. 6—11.

4. Рябов С.И., Ракитянская И.А. Роль мононуклеаров в поражении нефрона у больных хроническим гломерулонефритом // Нефрология.—1997.—Т. 1, № 2.—С. 45—52.

5. Рябов С.И., Ракитянская И.А. Способ определения индивидуальной чувствительности лимфоцитов к стероидам и цитостатикам // Патент на изобретение № 96 114 750.—1997.

6. Сергеев П.В., Сухова Т.А., Таканова Г.В. Влияние гидрокортизона, адреналэктомии и их сочетание на состав общих липидов и фосфолипидов плазматических мембран гепатоцитов крыс // Фармакол. и токсикол.— 1984. —№ 2.—С. 46—49.

7. Сергеев П.В. Механизмы взаимодействия глюкокортикоидов с клетками тимуса // Иммунофизиология / Е.А.Корнева.— СПб., 1996.—С. 510—519.

8. Alexopoulos E., Leontsini M., Papadimitrion M. Relationship between interstitial infiltrates steroid responsiveness of proteinuria in membranous nephropathy // Nephrol. Dial. Transplant.—1994.—Vol. 9, № 6.— P. 623—630.

9. Hopper J. Prednisolone in the treatment of idiopathic membranous nephropathy // New. Engl. J. Med. 1989.—Vol. 321.—P. 260—261 (letter).

10. Posner M.R., Reinhez E., Lread J. et al. Lymphoid subpopulations of peripheral blood and spleen in untreated Hodgkin's disease // Cancer.—1981.—Vol. 48, № 9.—P. 1170—1176.

11. Reisner J., Linker J., Sharon N. Separation of mousen thy monocytes into two subpopulation // J. Mol. Biol.— 1976.—Vol. 79.—P. 539—554.

12. Silverstone A., Sun L., Witte O.V., Baltimore D. Biosynthesis of murine terminal desoxynucleotidil transferase // J. Biol. Chem.-1980.— 225. —№ 8. —P. 791—796.

13. Tejani A., Butt K., Trachtman N. et al. Cyclosporine induced remission of relapsing nephrotic syndrome in children // J. Pediatr. 1987.—Vol. 111.— P. 1056—1062.