

Клінічна фізіологія та біохімія

УДК 616.6-616.611-002-616.002.1+616-092

Є.А. БУРЛАКА

*Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ;
Каролінський інститут, Стокгольм, Швеція*

Порушення в системі контролю апоптозу при хронічному гломерулонефриті у дітей

Захворюваність дітей на хронічне захворювання нирок (ХЗН) становить від 1,5 до 3,0 випадків на мільйон населення. ХЗН у дитячому віці спричиняють аномалії розвитку (вроджені аномалії нирок і сечовивідних шляхів), фокально-сегментарний гломерулосклероз (ФСГС), гемолітико-уремічний синдром (ГУС), імунно-комплексні захворювання і спадкові нефропатії, такі, як хвороба Альпорта [2,7]. Загальним патоморфологічним результатом, що стосується пошкодження нирок при ХЗН, є гломерулосклероз, склероз судин, тубуло-інтерстиційний фіброз. Адаптивні зміни нефронів після первинної травми з часом перестають компенсуватися, що в кінцевому підсумку призводить до незворотних порушень, – утворення рубців, склерозування і подальшої втрати нефронів, унаслідок чого формується термінальна стадія ХЗН (ТСХЗН) [2].

Запалення відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні хронічної патології нирок та є первинним і персистентним порушенням, на якому ґрунтуються інші ланки патогенезу. Гістологічно за хронічного перебігу патологій нирок, в тому числі при ХГН, тканини нирок характеризуються типовими ознаками запалення – інфільтрацією лейкоцитами, гіперемією, фіброзом. Крім цього, запалення при ХГН, як і фіброз, супроводжується активацією ренін-ангіотензин-альдостеронової системи та її основних ефекторних ланок – ангіотензину II, окисним стресом, ендотеліальною дисфункцією тощо [2, 6, 7]. Усі перелічені патофізіологічні порушення супроводжуються та є індукторами високих рівнів апоптозу клітин нирок. Апоптоз – запрограмована смерть клітини, спостерігається при захворюваннях нирок і відіграє важливу роль у їх фізіології. Шкідливі ефекти апоптозу полягають у тому, що в результаті його активації втрачається велика кількість клітин нирок під час або після ниркового запалення, утворюються рубці, втрачається функція нирок [1, 5].

Мета дослідження. Вивчити молекулярні механізми, які лежать в основі незворотних пошкоджень нирок при ХГН у дітей та залежать від апоптозу, їх корекцію існуючими схемами лікування, що необхідно для розробки подальших терапевтичних підходів.

Матеріали та методи дослідження. Проведено дослідження матеріалу біопсії нирок 23 пацієнтів віком 5–18 років з активною стадією нефротичної форми ХГН, які перебували на стаціонарному лікуванні в клініці дитячої нефрології ДУ «Інститут нефрології НАМН України» (клінічна база – ДКЛ № 7 м. Києва) в 2008–2012 рр. Комплекс обстеження, окрім загальноприйнятих методик (огляд, моніторинг ар-

теріального тиску, загальний та біохімічний аналіз крові, визначення добової протеїнурії, вивчення сечового осаду та концентраційної здатності нирок, УЗД органів черевної порожнини тощо), включав визначення в крові хворих показників рівня апоптозу, імуногістохімічну оцінку апоптозо-залежних гломерулярних і тубуло-інтерстиційних пошкоджень.

Імуногістохімічно рівні факторів системи контролю апоптозу (Вах, Vcl-xL) визначали на біопсійному матеріалі дітей з морфологічною формою хронічного гломерулонефриту фокально-сегментарний гломерулосклероз. Зрізи тканини нирок відмити від парафіну, дегідратовано. Як первинні антитіла використовували поліклональні анти-Vcl-xL (розведення 1:200), анти-Вах (розведення 1:200). Як вторинні флуоресцеїнівмісні антитіла використовували Alexa 546 Ab та Alexa 488 (Invitrogen, USA, розведення 1:500). Ядра клітин візуалізували за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI, 1,5 мг/мл), який додавали з фосфатним буфером під час останнього відмивання зрізів. Перед мікроскопією скельця з клітинами покривали Immu-Mount (Thermo Shandon, Midland, Canada).

TUNEL-тест для визначення рівня апоптозу в біопсійному матеріалі нирок пацієнтів проводили на формалін-фіксованих парафінових зрізах товщиною 5 μm . Зрізи нирок обробляли протеїназою K (20 мг/мл) протягом 20 хв за температури 37 °C. Ендогенна активність пероксидази зрізів нирок була заблокована інкубацією в 0,3% H_2O_2 в фосфотному буфері (pH-7,4) протягом 10 хв. Для визначення апоптозу клітин використовували Peroxidase in Situ Apoptosis detection Kit (Chemicon International, Велика Британія). Зрізи контрастували гематоксиліном Харріса (Richard Allan Scientific, США).

Знімки отримували за допомогою Zeiss LSM 510 інвертованого сканувального лазерного конфокального мікроскопа з використанням $\times 40/1.4$ N.A. олійно-імерсійного об'єктива. Знімки опрацьовували з застосуванням програмного забезпечення Zeiss. Оптична товщина зрізу становила 1–2 мкм.

Матеріал опрацьовано за допомогою методів варіаційної статистики (STATISTICA 6.0) та непараметричних статистичних підходів (Mann-Whitney test). Результати представлено як Mean \pm SEM, статистично достовірним вважався рівень $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Проаналізовано рівні експресії та топічну локалізацію проапоптозного фактора Вах у пацієнтів із морфологічним варіантом хронічного гломерулонефриту фокально-сегментарний гломерулосклероз, асоційованим із запаленням. Стадії ФСГС визначали за рівнем склерозованої площі клубочка. Так, рівень склерозу при I ст. ФСГС становив ≤ 25 % клубочка, при II ст. ФСГС – 25–50 %, при III ст. ФСГС – 50–75 %, при IV ст. – 75–100 %.

Результати проведеного аналізу рівнів Вах у зрізах біопсійного матеріалу нирок дітей з морфологічною формою хронічного гломерулонефриту фокально-сегментарний гломерулосклероз із ознаками запалення виявили високий рівень показника як у клубочку, так і в тубуло-інтерстиційному сегменті. При цьому вищий рівень імуносигналу зафіксовано в клубочках порівняно з тубуло-інтерстиційним сегментом при ФСГС I-II ст. ($43,57 \pm 0,88$ відн. од. проти $24,9 \pm 0,41$ відн. од., $p < 0,01$). При повному склерозуванні клубочка високий рівень імуносигналу Вах локалізується в тубуло-інтерстиційному сегменті ($13,7 \pm 0,42$ відн. од. проти $22,5 \pm 0,65$ відн. од., $p < 0,01$) (рис.1).

Важливу роль у розвитку апоптозу відіграє співвідношення рівня факторів Vcl-xL/Вах. Результати проведеного аналізу рівнів анти-апоптозного фактора Vcl-xL у зрізах біопсійного матеріалу нирок дітей з морфологічною формою хронічного гломерулонефриту фокально-сегментарний гломерулосклероз з ознаками запалення виявили наявність

певного рівня Bcl-xL як у клубочку, так і в тубуло-інтерстиційному сегменті. При цьому вищий рівень імуносигналу зафіксовано в тубуло-інтерстиційному сегменті, порівняно з клубочком із рівнем склерозу I–II ст. ($25,29 \pm 0,55$ відн. од. проти $8,71 \pm 0,8$ відн. од., $p < 0,01$). При повному склерозування клубочка відносно високі рівні імуносигналу Bcl-xL локалізуються в оточуючому тубуло-інтерстиційному сегменті за практично повної відсутності в клубочку ($19,57 \pm 1,02$ відн. од. проти $6,81 \pm 0,31$ відн. од., $p < 0,01$) (рис. 2).

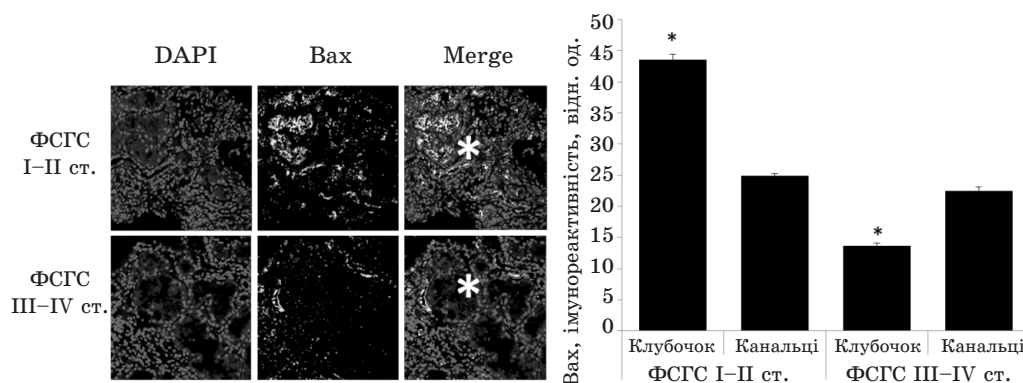


Рис. 1. Топічна характеристика рівнів проапоптозного фактора Вах при різних ступенях ФГС, що розвивався в результаті нефротичного синдрому. DAPI – візуалізація ядер; Вах – імуносигнал Вах у тканині нирки; Merge – сумісне зображення; * – клубочок

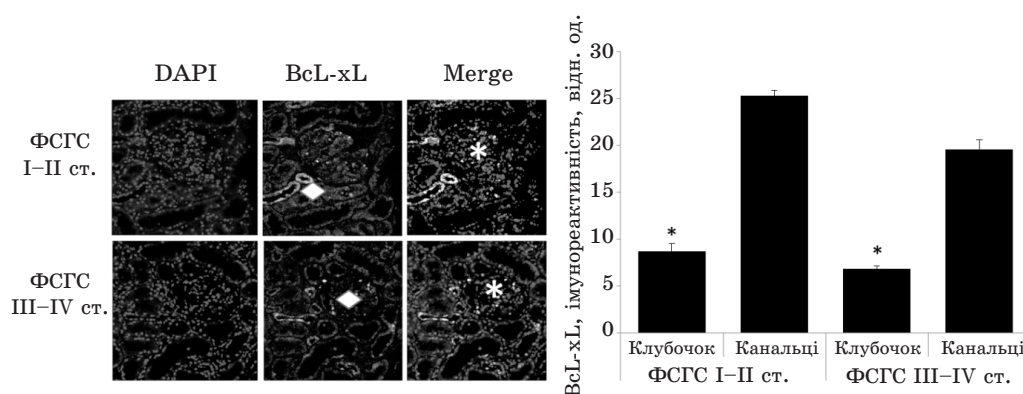


Рис. 2. Топічна локалізація рівнів антиапоптозного фактора Bcl-xL при різних ступенях ФГС, що розвивався в результаті нефротичного синдрому. DAPI – візуалізація ядер; Bcl-xL – імуносигнал Bcl-xL у тканині нирки; Merge – сумісне зображення; * – клубочок, \diamond – каналіці

Результати проведеного аналізу рівня апоптозу в зрізах біопсійного матеріалу нирок дітей з морфологічною формою хронічного гломеруло-нефриту фокально-сегментарний гломерулосклероз виявили наявність високого рівня апоптозних клітин. Що більше, показано, що в склерозованих клубочках із рівнем гломерулосклерозу II–III ст. більшість апоптозних клітин локалізується в клубочках (рис. 3, а). При повному склерозування клубочка високий рівень апоптозу виявлено в оточуючому тубуло-інтерстиційному сегменті (рис. 3, б). Кількісний аналіз показав, що при ФГС I–II ст. індекс апоптозу в клубочках становив $22,29 \pm 0,86$ %, що є достовірно вищим від показника в тубуло-інтерстиційному компоненті – $9,43 \pm 0,59$ % ($p < 0,01$). За високих рівнів склерозування розподіл апоптозних клітин був іншим. Вищий індекс апоптозу (IA) виявлено в тубуло-інтерстиційному компоненті –

29,27 ± 1,18 %, натомість у клубочках ІА становив 4,7 ± 0,54 % ($p < 0,001$) (рис. 3, в).

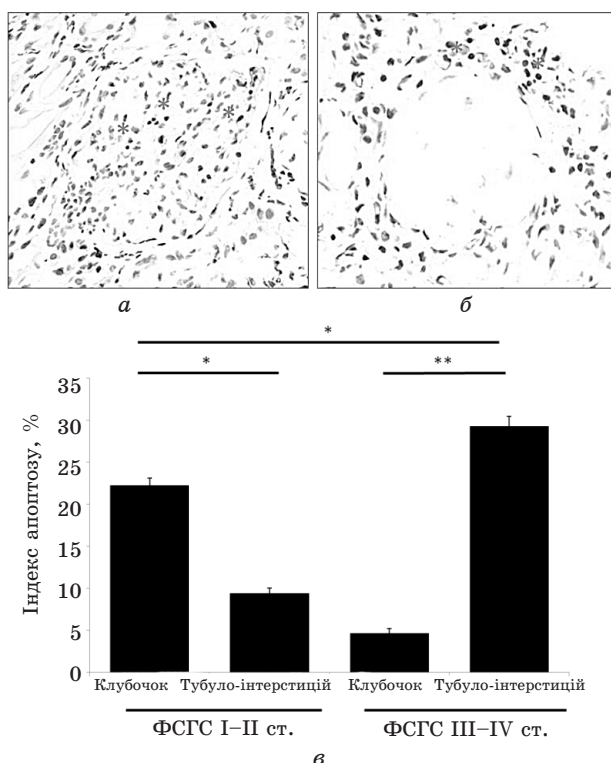


Рис. 3. Рівні апоптозу в тканинах нирок при ХГН у дітей

Контроль і регулювання сигнального шляху апоптозу відбувається за участю білків родини Bcl-2. Bcl-2 бере участь у регуляції проникності мембран мітохондрій і представлений як проапоптозними, так і антиапоптозними білками. До антиапоптозних належать Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-W, BAG, до проапоптозних – Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bcl, Bk. Зрушення балансу активності факторів цієї родини в той чи інший бік призводить до зниження чи зростання рівнів апоптозу, що є патологією [8,12].

Дисбаланс між загибеллю та проліферацією клітин призводить до порушень того чи іншого характеру в структурі та функціонуванні нирок. Наприклад, за переважання процесів проліферації клітин відбувається їх надмірне накопичення – неоплазія, що характерно для проліферативних форм гломерулонефриту. Зростання рівнів загибелі клітин, зокрема, за рахунок апоптозу, спричинює незворотність втрати тих чи інших функцій через нездатність до відновлення клітин. Апоптоз регулюється позаклітинними і внутрішньоклітинними молекулами-регуляторами, які є учасниками відповідних сигнальних шляхів. Загибель клітин зазвичай відбувається у відповідь на зміни в осередку (мікросередовищі), в якому відсутні певні фактори (чинники виживання) або наявні проапоптозні фактори. Ініціальними факторами при цьому можуть бути навколишні клітини, медіатори і компоненти позаклітинного матриксу [3,8]. Процес загибелі клітин починається з активації внутрішньоклітинних факторів у відповідь на проапоптозні стимули мікрооточення клітини. Наявність Fas на клітинній поверхні є однією з детермінант чутливості клітини до Fas-індукованого апоптозу. Мезангіальні клітини, проксимально тубулярні клітини нирок, фіброласти експресують клітинні рецептори Fas. Наприклад, надмірна

експресія проапоптозного фактора Вах індукує каспаза-незалежний механізм загибелі клітин.

Мітохондрії є ключовими учасниками апоптозу, що не мають зв'язку з рецепторами смерті, а мітохондріально-залежні порушення можуть сприяти загибелі клітин незалежно від активації рецепторів загибелі. Мітохондріальні зміни при апоптозі включають:

1) зникнення мітохондріального трансмембранного градієнта потенціалу ($\Delta\Psi_m$) у зв'язку з відкриттям транзиторних пор;

2) звільнення білків, таких, як цитохром с, AIF та SMAC/Diablo, з мітохондріального міжмембранного простору в цитозоль, де вони беруть участь у ефektorній фазі апоптозу – безпосередній активації каспаз [10].

Основними механізмами дії антиапоптозних факторів родини Bcl-2 є такі. Перший реалізується за рахунок інгібування прокаспаз у апоптосомі. При цьому Bcl-xL інгібує комплекс, утворений каспазою-9, Araf-1 і цитохромом С, що в кінцевому підсумку запобігає активації каспази-3. Другий сценарій полягає в закритті VDAC і запобіганні виходу мітохондріальних апоптогенних факторів, таких, як цитохрому С і AIF, у цитоплазму [10, 11, 13].

Висновки. Таким чином, прогресування гломерулосклерозу при досліджених патологіях супроводжується зростанням активності про-апоптозного фактора Вах та одночасним зниженням рівня анти-апоптозного фактора Bcl-xL. Виявлено залежність топичності рівнів Bcl-xL від ступеня ФСГС, що свідчить про етапність розвитку гломерулярних і тубуло-інтерстиційних пошкоджень під впливом протеїнурії. Виявлені відмінності в рівнях та їх співвідношення при ФСГС, що є результатом нефротичного синдрому та IgA нефропатії, свідчать про безпосередню залежність рівня гломерулярних і тубулярних пошкоджень від рівня протеїнурії.

Протеїнурія є маркером пошкодження нирок, що відображає втрату селективності фільтраційного бар'єра. Крім цього, протеїнурія є визначальним чинником розвитку і прогресування пошкодження нирок унаслідок активації апоптозу, запалення, фіброзу [4]. Висока концентрація білка в ультрафільтраті спричинює апоптоз проксимально-тубулярних клітин. Апоптоз при цьому є наслідком запально-асоційованих процесів та безпосереднього впливу білка. Активованій у проксимально-тубулярних клітинах апоптоз призводить до тубулярної атрофії, виникнення атубулярних клубочків [4, 9]. Наявність атубулярних клубочків визначає стан зміни функції нирок, з одного боку, та прогресування тубуло-інтерстиційних пошкоджень – з іншого [9]. Ініціаторами апоптозу може бути низка факторів – супероксидні радикали та їх метаболіти (радикальні форми кисню, РФК), гіпоксія, фактор росту фібробластів, ангіотензин II [1,5].

Подальше дослідження молекулярних механізмів виникнення апоптозу при протеїнуричних захворюваннях нирок у дітей і створення підходів до їх корекції є перспективним напрямом з точки зору запобігання та уповільнення пошкодження нирок.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Abbate M.* How does proteinuria cause progressive renal damage? / M. Abbate, C. Zoja, G. Remuzzi // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – Vol. 17. – P. 2974–2984.
2. *Brantsma A.H.* What predicts progression and regression of urinary albumin excretion in the nondiabetic population? / A.H. Brantsma, J. Athobari, S.J. Bakker // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 637.
3. *Brunelle J.K.* Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family / J.K. Brunelle, A. Letai // *J. Cell. Sci.* – 2009. – Vol. 122. – P. 437–441.
4. *Chevalier R.* Generation and Evolution of Atubular Glomeruli in the Progression of Renal Disorders / R. Chevalier, M. Forbes // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – Vol.19. – P. 197–206.
5. *Christman J.W.* Redox Regulation of Nuclear Factor Kappa B: Therapeutic Potential for Attenuating Inflammatory Responses / J.W. Christman, T.S. Blackwell, B.H.J. Juurlink // *Brain Pathology.* – 2000. – Vol. 10. – P. 153–162.
6. *Favaloro B.*

Role of apoptosis in disease / B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano [et al.] // *Aging*. – 2012. – Vol. 4, N 5. – P. 330–349. 7. Fogo A.B. Mechanisms of progression of chronic kidney disease / A.B. Fogo // *Pediatr. Nephrol.* – 2007. – Vol. 22, N 12. – P. 2011–2022. 8. Kinnally K.W. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis / K.W. Kinnally, B. Antonsson // *Apoptosis*. – 2007. – Vol. 12, N 5. – P. 857–868. 9. Ruggenti P. Retarding progression of chronic renal disease: The neglected issue of residual proteinuria / P. Ruggenti, A. Perna, G. Remuzzi // *Kidney Int.* – 2003. – Vol. 63. – P. 2254–2261. 10. Shimizu S. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC / S. Shimizu, M. Narita, Y. Tsujimoto // *Nature*. – 1999. – Vol. 399, N 6735. – P. 483–487. 11. Sun X.M. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein / X.M. Sun, S.B. Bratton, M. Butterworth [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2002. – Vol. 277, N 13. – P. 11345–11351. 12. Takase O. Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis / O. Takase, A.W. Minto, T.S. Puri [et al.] // *Kidney Int.* – 2008. – Vol. 73. – P. 567–577. 13. Trécherel E. Upregulation of BAD, a pro-apoptotic protein of the BCL2 family, in vascular smooth muscle cells exposed to uremic conditions / E. Trécherel, C. Godin, C. Louandre [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 6, N 417. – P. 479–483.

Стаття надійшла до редколегії 14.11.14

НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ КОНТРОЛЯ АПОПТОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ

Е.А. БУРЛАКА

*Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев;
Каролинский институт, Стокгольм, Швеция*

Изучены топические особенности уровней факторов, контролирующих апоптоз, в ткани почек у детей с хроническими гломерулопатиями. 23 пациента в возрасте 5–18 лет с активной стадией нефротической формы хронического были включены в исследование. Иммуногистохимически проведено исследование уровней проапоптозного фактора Вах, антиапоптозного фактора Bcl-XL, уровня апоптоза на образцах биопсии почек.

Анализ уровня проапоптозного фактора Вах в срезах почек с морфологической формой хронического гломерулонефрита очаговый сегментарный гломерулосклероз с признаками воспаления показал наличие высоких уровней Вах в клубочковом и тубуло-интерстициальном сегментах. Однако высший уровень иммуносигнала зафиксирован в клубочках с ФСГС I–II ст. по сравнению с тубуло-интерстицием. При полном клубочковом склерозе наблюдается высокий уровень Вах в окружающих канальцах и интерстициальном сегменте.

Исследованы уровни антиапоптозного фактора Bcl-xL. В срезах почек, полученных у детей с морфологической формой хронического гломерулонефрита очаговый сегментарный гломерулосклероз с признаками воспаления, выявлено наличие определенного уровня Bcl-xL и в клубочках, канальцах и интерстиции. Высший уровень иммуносигнала зарегистрирован в канальцах, интерстициальном сегменте, по сравнению с клубочками с ФСГС I–II ст. При полном склерозировании клубочков относительно высокий уровень иммуносигнала Bcl-xL локализован в окружающих канальцах, интерстициальном сегменте почек при почти полном отсутствии в клубочках.

Количественный анализ уровня апоптоза в срезах почек у пациентов с нефротическим синдромом и ФСГС I–II ст. показал индекс апоптоза (ИА) в клубочках на уровне $22,29 \pm 0,86$ %, что превышает показатель в канальцах и интерстициальном сегменте – $9,43 \pm 0,59$ % ($p < 0,01$). При ФСГС III–IV ст. высокий ИА был зафиксирован в канальцах, интерстициальном сегменте – $29,27 \pm 1,18$ %, по сравнению с клубочками – $4,7 \pm 0,54$ % ($p < 0001$).

Таким образом, прогрессирование гломерулосклероза при исследуемых патологиях сопровождается повышением активности проапоптозного фактора Вах с одновременным снижением антиапоптозного фактора Bcl-xL. Зависимость отношения уровней топической активности Вах и Bcl-xL от стадии ФСГС указывает на стадийный тип развития клубочковых и интерстициальных повреждений при воздействии протеинурии.

Ключевые слова: нефротический синдром, гломерулосклероз, апоптоз, Bax, Bcl-xL, иммуногистохимия.

VIOLATIONS IN APOPTOSIS CONTROL SYSTEM IN CHILDREN WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

E. BURLAKA

*A. Bohomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine;
Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

Proteinuria is a marker of kidney damage, reflecting the loss of selectivity of the filtration barrier. Moreover, proteinuria is a determining factor in the development and progression of kidney damage due to activation of apoptosis, inflammation, fibrosis, vascular damage.

The objective of this paper was to study the topical features of factors controlling apoptosis activity levels in kidney tissue in children with chronic glomerular diseases.

23 patients aged 5–18 years with active stage of nephrotic type of chronic glomerulonephritis were included to the study. Immunohistochemical examination of proapoptotic factor Bax, antiapoptotic factor Bcl-xL levels, apoptosis evaluation on kidney biopsy specimens were done.

Analysis of the level of proapoptotic factor Bax levels in kidney slices obtained from children with morphological forms of chronic glomerulonephritis, focal segmental glomerulosclerosis with signs of inflammation, showed the presence of high levels of Bax in both glomerular and tubular-interstitial segments. However, higher immunosignal was recorded in glomeruli with FSGS I-II st. compared to tubular segment. When complete glomerular sclerosis observed high levels of Bax are localized in the surrounding tubuli and interstitial segment.

Levels of anti-apoptotic factor Bcl-xL levels were studied. In kidney sections obtained from children with morphological forms of chronic glomerulonephritis, focal segmental glomerulosclerosis with signs of inflammation the presence of a certain level Bcl-xL in both glomeruli and tubuli interstitium was found. Higher immunosignal was recorded in tubuli, interstitial segment compared to glomeruli with FSGS I-II st. When complete glomerular sclerosis relatively high immunosignal of Bcl-xL is localized in the surrounding tubuli, interstitial segment with the almost complete absence of glomeruli.

The results of analysis of the level of apoptosis in sections of kidney biopsy material from children with morphological form of chronic glomerulonephritis focal segmental glomerulosclerosis revealed the presence of a high level of apoptotic cells. Moreover, we show that in sclerotic glomeruli with glomerulosclerosis level II-III the majority of apoptotic cells localized in the glomeruli. Quantitative analysis of apoptosis levels in kidney sections of patients with nephrotic syndrome and FSGS I-II st. revealed apoptotic index (AI) in glomeruli at level $22,29 \pm 0,86$ %, in the tubuli and interstitial component – $9,43 \pm 0,59$ % ($p < 0,01$). With FSGS III-IV st. high AI was found in tubuli, interstitial component – $29,27 \pm 1,18$ %, in the glomeruli – $4,7 \pm 0,54$ % ($p < 0,001$).

Thus, the progression of glomerulosclerosis in the studied pathologies accompanied by increased activity of proapoptotic factor Bax and simultaneous reduction of anti-apoptotic factor Bcl-cxL. The dependence of levels of topical Bax and Bcl-xL expression on stages of FSGS indicate the step-dependent manner of glomerular and interstitial injuries development under the influence of proteinuria.

The differences between levels of the damages and their correlation in patients with FSHS resulting from nephrotic syndrome and IgA nephropathy indicates direct dependence of glomerular and tubular damage on the level and type of proteinuria.

Further study of the molecular mechanisms of apoptosis in proteinuric kidney disease in children and approaches development to their correction is a promising direction in terms of preventing and slowing down the kidney damage development.

Key words: nephrotic syndrome, glomerulosclerosis, apoptosis, Bax, Bcl-xL, immunostaining.