

УДК 616.61-616.611-002-07-08

Є. А. Бурлака

Національний медичний університет імені
О.О. Богомольця (бульвар
Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна, 01601)
Каролінський інститут (Karolinska
Institutet, Department of Woman's and
Children's Health, Q2:09 Astrid Lindgren
Children's Hospital, 171 76 Stockholm,
Sweden)

ЕФЕКТОРИ АПОПТОЗУ ПРИ ПРОГРЕСУВАННІ ХРОНІЧНОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТУ У ДІТЕЙ

Ключові слова: хронічний гломеру-
лонефрит, прогресування, апоптоз,
Вах, каспаза-8.

Резюме. Показано, що розвиток апоптозу при ХГН у дітей залежить від активації зовнішнього сигнального шляху, ефектором якого є каспаза-8, та внутрішнього мітохондріального сигнального шляху, про що свідчить зростання активності про-апоптозного фактора Вах. Виявлено залежність експресії та топічної локалізації Вах від ступеня патоморфологічних порушень при фокально-сегментарному гломерулосклерозі. Отримані дані є перспективними в плані удосконалення схем лікування дітей з ХГН з використанням терапевтичних впливів, що можуть безпосередньо та опосередковано впливати на апоптоз, зокрема засобів, що впливають на запалення (кортикостероїди, імуносупресори, антиоксиданти) та знижують фіброз, альбумінурію (інгібітори АПФ).

Вступ

Хронічні захворювання нирок з ураженням гломерулярного сегмента нефрону можуть виникнути в результаті впливу ряду етіопатогенетичних факторів. Однак, незважаючи на широкий спектр патологічних процесів, які можуть викликати пошкодження нирок, істотні втрати нефронів провокує загальний синдром, який характеризується клінічно системною артеріальною гіпертензією, протеїнурією, фіброзом. Патоморфологічно кінцевим результатом втрати функції нирок є інтерстиціальний фіброз, гломерулярний склероз, формування атубулярних клубочків [1].

Протеїнурія виникає при пошкодженні гломерулярного фільтраційного бар'єра, та посилюється за рахунок клубочкової капілярної гіпертензії. В результаті цього надлишок білка в ультрафільтраті сягає просвіту проксимальних каналців [2]. Фільтровані білки засвоюються проксимально тубулярними клітинами шляхом ендцитозу і стимулюють продукцію цитокінів, які виділяються в інтерстицій та є активаторами макрофагів, міграції лімфоцитів, проліферації фіброblastів і збільшення виробництва зовнішньоклітинного матриксу. Крім того, білок ультрафільтрату є безпосереднім активатором апоптозу. [2-4].

Апоптоз є запрограмованою смертю клітини та механізмом їх делеції, що за фізіологічних умов бере участь у процесах відновлення тканин, ембріогенезі, гормон-залежній атрофії. Процес розвитку апоптозу перебуває під контролем акти-

ваторних сигналів, які можуть діяти як позаклітинно (зовнішні індуктори) так і внутрішньоклітинно (внутрішні індуктори). Позаклітинні сигнали включають у себе токсини, гормони, фактори росту, радикальні форми кисню [5,6]. Апоптоз супроводжує життєдіяльність усіх органів та систем організму. Його позитивний вплив реалізується, зокрема, при елімінації клітин у зонах гіперцелюлярності, що виникають при гострому запаленні, фізіологічному ремоделюванні тканин. [7,8]. Контроль апоптозу визначається рівнем активності факторів про- та антиапоптозного впливу. Зміщення балансу в бік зростання активності проапоптозних факторів відбувається під впливом таких ініціальних чинників як клітинна гіпоксія, окисний стрес, запалення [3,9].

Дослідження молекулярних процесів, що лежать в основі порушення функції нирок під впливом протеїнурії, та морфологічних субстратів пошкодження, вимагають додаткового дослідження з метою створення нових підходів до лікування.

Мета роботи

Дослідити ефектори сигнального шляху апоптозу при ХГН у дітей.

Матеріал і методи

Дизайн дослідження – одномоментне (cross-sectional study), об'єкт – 56 пацієнтів (віком від 5 до 18 років) з активною стадією нефротичної форми ХГН, які перебували на стаціонарному

лікуванні в клініці дитячої нефрології ДУ «Інститут нефрології АМН України» (клінічна база – ДКЛ №7 м. Києва) в 2009-2012 роках. Стан КФ було оцінено з використанням стандартної формули Шварца в мл/хв/1.73 м².

Залежно від стану функції нирок хворі були розподілені на групи: ХЗН I (швидкість КФе⁹⁰ 30-89 мл/хв/1.73 м²) – n=29, ХЗН II-III (швидкість КФ 30-89 мл/хв/1.73 м²) – n=17. Пацієнти з швидкістю КФ < 30 мл/хв/1.73 м² були виключені з дослідження. Групу контролю склали 15 умовно здорових дітей, яким в ході клініко-лабораторного обстеження були виключені захворювання нирок.

Комплекс обстеження, окрім загальноприйнятих методик (огляд, моніторинг артеріального тиску, загальний та біохімічний аналізи крові, визначення добової протеїнурії, вивчення сечового осаду та концентраційної спроможності нирок, УЗД органів черевної порожнини, тощо), включав визначення показників у крові хворих, які є показниками апоптозу.

Визначення рівнів факторів проапоптозного фактора Вах, каспази-8 проводили з використанням методу Western Blotting. Для підготовки зразків плазму та суспензію нейтрофілів хворих розводили в буфері (50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM дигіотреїтол, 0,5% деоксихлорат натрію, 1,5% NP-40, 1 mM фенілметилсульфоніла флюорит) у співвідношенні 1:100. До зразка додавали інгібітори протеаз (Protease cocktail inhibitor, Roche Diagnostics, USA) в співвідношенні 1:1000 до кінцевого об'єму. Розрахунок об'єму зразків при нанесенні в гель для електрофорезу виконано з урахуванням концентрації загального білка плазми обстежених та суспензії клітин за методом Бредфорда (Bio-Rad protein assay, США).

Електрофорез зразків проводили в 12,5% поліакриламідному гелі з наступним трансфером на полівінілден-дифлюоридні мембрани та блокуванням мембран у 5% знежиреному молоці на TBS-T (136 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% Tween 20). Інкубацію з первинними антитілами (Rabbit anti-Waх-3Ab, BD Transduction Laboratories, Rabbit polyclonal caspase-8, Abcam) у співвідношенні 1:500 проводили протягом 12 годин при температурі 4С. Як вторинні антитіла використовували Anti-rabbit horsredish peroxidase Ab (GE Healthcare) у концентрації 1:3000 з інкубуванням протягом 1 години при кімнатній температурі. Після відмивання мембран за допомогою TBS-T проведено візуалізацію білків із використанням хеїлюмінісцентного субстрату ECL (GE Healthcare). Для контролю об'єму зразків, нанесених у гель при електрофорезі, використано β-актин.

Імуногістохімічне визначення експресії факторів

системи контролю апоптозу визначали на біотичному матеріалі дітей із морфологічною формою хронічного гломерулонефриту фокального сегментарного гломерулосклерозу. Зрізи тканини нирок були відмиті від парафіну, дегідратовані. Як первинні антитіла використовували поліклональні антитіла анти-Waх (розведення 1:200). Як вторинні флуоресцеїн-вмісні вторинні антитіла використовували Alexa 488 Ab (Invitrogen, USA, розведення 1:500). Ядра клітин візуалізувалися за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI, 1,5 мкг/мл), що додавався з фосфатним буфером при останньому відмиванні зрізів. Перед мікроскопією скельця з клітинами покривалися Immu-Mount (Thermo Shandon, Midland, Canada).

Отримання знімків проводилася з використанням Leica TCS SP інвертованого скануючого лазерного конфокального мікроскопа з використанням x40/1.4 N.A. олійно-імерсійного об'єктива. Знімки були опрацьовані з використанням програмного забезпечення Leica. Оптична товщина зрізу становила 1-2 мкм.

Матеріал опрацьовано з використанням методів варіаційної статистики (STATISTICA 6.0) та непараметричних статистичних підходів (Mann-Whitney test). Результати представлено як Mean±SEM, статистично вірогідним вважався рівень P<0.05.

Обговорення результатів дослідження

Дослідження рівня активації проапоптозного фактору при ХГН у дітей виявило значне підвищення експресії Вах. При цьому, ступінь активації залежить від наявності порушення функції нирок. Так, при збереженій функції (ХЗН I ст.) експресія Вах була підвищена до 60.3±7.5%, порівняно з контролем. При зниженні КФ (ХЗН II-III ст.) спостерігалось підвищення рівня показника на 90.1±9.8% (p<0.01 та p<0.001, відповідно, в порівнянні з групою Контролю) (рис. 1).

Дослідження рівня активності проапоптозного ефектора каспази-8 виявило значне підвищення його експресії у всіх обстежених пацієнтів. При цьому, ступінь активації каспази-8 залежить від наявності порушення функції нирок. Так, при збереженій функції (ХЗН I ст.) експресія каспази-8 була підвищена на 24.8±4.3%, порівняно з контролем (p<0.01). При зниженні КФ (ХЗН II-III ст.) спостерігалось зростання активності каспази-8 на 27.5±5.9% (p<0.001, в порівнянні з групою Контролю). При цьому, при порівнянні активності каспази-8 між двома групами пацієнтів з ХГН, достовірної різниці не виявлено (рис. 2).

Було проаналізовано рівні експресії та топічну локалізацію Вах у пацієнтів з морфологічним варіантом хронічного гломерулонефриту фокальний сегментарний гломерулосклероз, асоційова-

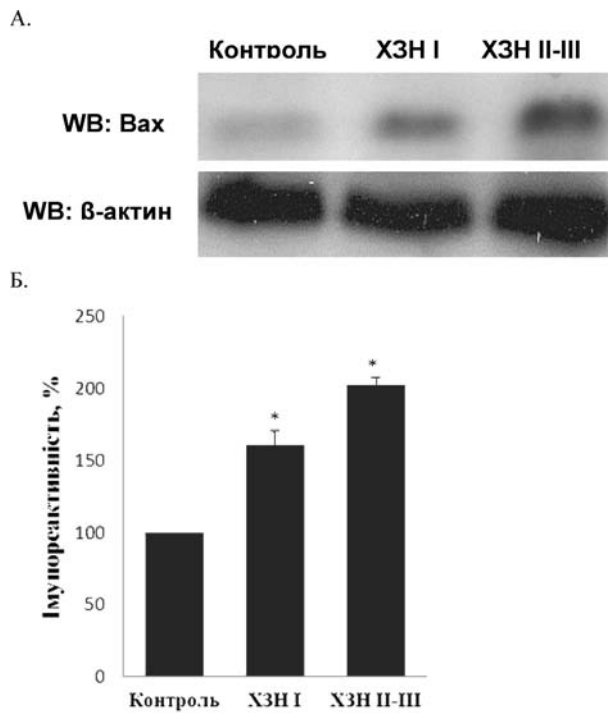


Рис. 1. Рівні активності Вах у дітей з ХГН. А – рівні Вах; Б – імунореактивність Вах; *- $p \leq 0,05$

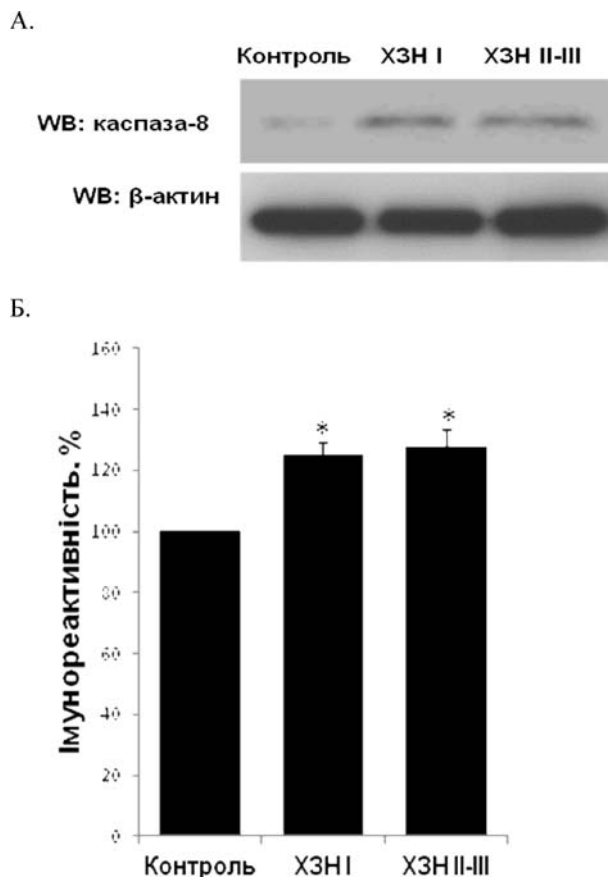


Рис. 2. Рівні активності каспази-8 у дітей з ХГН. А – рівні каспази-8; Б – імунореактивність; *- $p \leq 0,05$

ним із запаленням.

Результати проведеного аналізу рівня експ-

ресії про-апоптозного фактора Вах в зрізах біопсійного матеріалу нирок дітей із морфологічною формою хронічного гломерулонефриту фокально-сегментарний гломерулосклероз з ознаками запалення виявив наявність високого рівня експресії Вах як у клубочку так і в тубуло-інтерстиційному сегменті. При цьому, вищий рівень імуносигналу був зафіксований у клубочках із рівнем склерозу II-III ст. При повному склерозування клубочка високий рівень експресії Вах локалізується в оточуючому тубуло-інтерстиційному сегменті (рис. 3).

Апоптоз є регульованим механізмом смерті клітин. Каспази, що належать до родини цистеїнових протеаз, є центральними регуляторами апоптозу. Існують два сигнальних шляхи активації апоптозу. Внутрішній сигнальний шлях активується за рахунок впливу різноманітних стимулів, вплив яких не вимагає взаємодії з рецепторами [3]. При цьому активуються внутрішньоклітинні сигнали, які діють безпосередньо на мітохондрії, що призводить до змін у їх внутрішній мембрані, відкриття мітохондріальних транзитних пор, втрати трансмембранного потенціалу мітохондрій і вивільнення проапоптозних білків із міжмембранного простору мітохондрій у цитозоль. Друга група проапоптозних білків, які беруть участь в активації внутрішнього сигнального шляху, - AIF, ендонуклеаза G та CAD, реалізуються з мітохондрій. CAD транслокується в ядро, де після розщеплення каспази-3, призводить до фрагментації ДНК [3,10].

Контроль і регулювання внутрішнього сигнального шляху апоптозу відбувається за участю білків родини Bcl-2. Bcl-2 беруть участь у регуляції проникності мембран мітохондрій та 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, Вах, Bak, Bid, Bad, Бік, Blk [5,11].

Отримані нами результати свідчать про те, що при ХГН у дітей молекулярним механізмом розвитку апоптозу є активація як внутрішнього, так і зовнішнього сигнального шляху апоптозу, про що свідчить активація проапоптозного білка Вах та апоптозного ефектора каспази-8. Імуногістохімічно виявлено різницю рівнів експресії Вах при рівних стадіях ФСГС. Останнє є доказом того, що дисбаланс активності Вах бере участь у розвитку гломерулярного апоптозу на ранніх етапах ФСГС, та тубулоінтерстиційного апоптозу при більш виражених стадіях ФСГС.

Група внутрішньоклітинних протеаз, званих каспаз, несуть відповідальність за активацію апоптозу клітини за рахунок активації, так званого, зовнішнього сигнального шляху апоптозу. Кас-

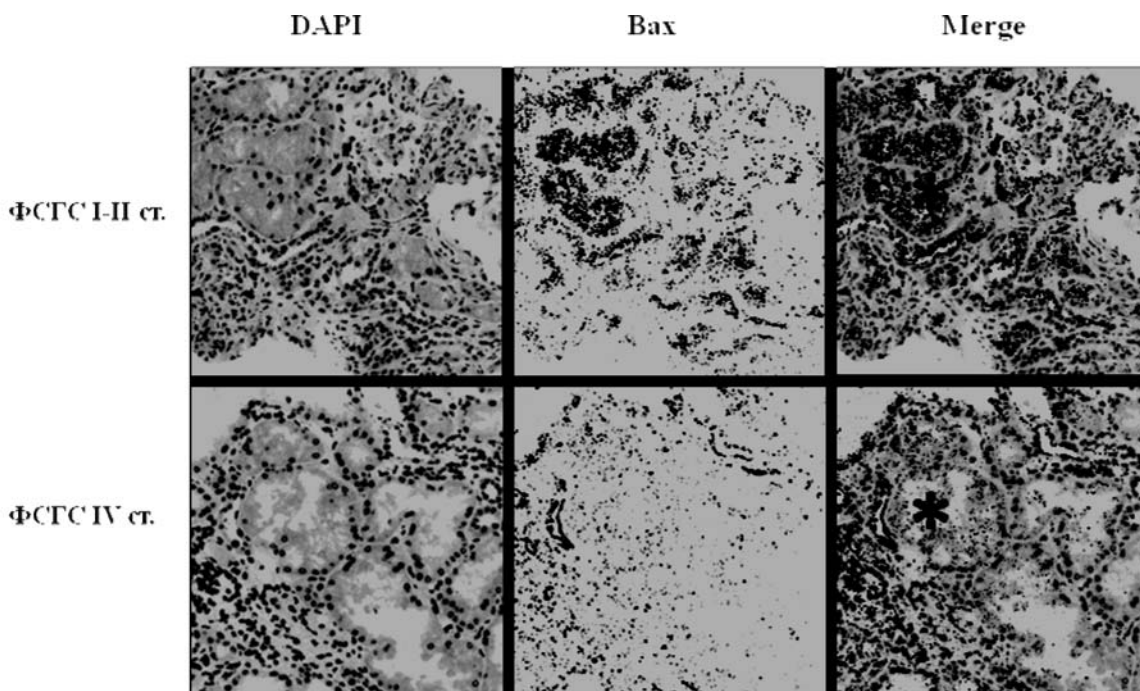


Рис. 3. Топічна локалізація експресії про-апоптозного фактора Bax при різних ступенях ФСГС. DAPI – візуалізація ядер, Bax – імуносигнал Bax в тканині нирки, Merge - сумісне зображення, * - клубочок

пази присутні у вигляді неактивних про-ферментів, які активуються шляхом протеолітичного розщеплення. Каспаза-8 ініціює активацію апоптозу у відповідь на позаклітинні апоптоз-індукуючі ліганди [12]. Отримані нами результати свідчать про активацію каспази-8 у всіх дітей із ХГН. При цьому, рівень експресії каспази-8 практично однаково виражений не залежно від ступеня порушення функції нирок. Останнє свідчить про участь каспази-8 як ефектора зовнішнього сигнального шляху апоптозу в пошкодженні нирок на всіх стадіях прогресування ХГН у дітей.

ХГН супроводжується запаленням, рівень якого визначається стадією захворювання. Моноцити і/або макрофаги, що є клітинними ефекторами хронічного запалення, беруть участь у синтезі цитокінів. У відповідь на первинне пошкодження гіперекспресія макрофагами колонієстимулюючого фактора сприяє їх поширенню в пошкоджених тканинах [13]. Ці клітини посилюють синтез цитокінів в ділянках їх інфільтрації, що сприяє фіброзоутворенню при хронічному процесі. Останній що є індуктором апоптозу [13-15]. Так, колаген I, фібрoneктин, що є компонентами фіброзного матеріалу клубочка, виступають у ролі індукторів сигнальних шляхів апоптозу. Крім того, окисні модифікації компонентів фіброзного матрикса, що виникають у результаті асоційованих із хронічним запаленням окисних пошкоджень, виступають в ролі індукторів

апоптозу [13, 14]. Апоптоз клітин клубочка (мезангіальних, подоцитів, ендотеліальних клітин) при гломерулонефриті є взаємопов'язаним. Наприклад, апоптоз мезангіальних клітин може бути результатом порушення балансу активності про- та антиапоптозних факторів інших клітин клубочка [4].

Протеїнурія при гломерулярних захворюваннях нирок сприяє розвитку тубулоінтерстиційних пошкоджень. Одним з механізмів пошкоджуючого впливу протеїнурії є надмірна реабсорбція білків клітинами проксимальних канальців, що може призвести до їх пошкодження і загибелі [13,16]. У відповідь на надмірну лізосомальну деградацію білків або інших токсичних сполук, присутніх в ультрафільтраті, проксимально-тубулярні клітини виробляють різні прозапальні і профібротичні молекули [15]. Інтерлейкін-8 (IL-8), фактор некрозу пухлини- α (ФНП- α), ендотелін, TGF- β і колаген (18, 19) сприяють розвитку проліферативних процесів, фіброзу. Початок інтерстиційного фіброзу характеризується інфільтрацією інтерстиція запальними клітинами, в основному макрофагами і Т-клітинами, які викликають активацію фібробластів [12,13]. Збільшення синтезу компонентів і ремоделювання позаклітинного матриксу призводить до його накопичення і фіброзу, що виступає в ролі активатора апоптозу [12].

Високі концентрації білка в ультрафільтраті безпосередньо викликають апоптоз проксималь-

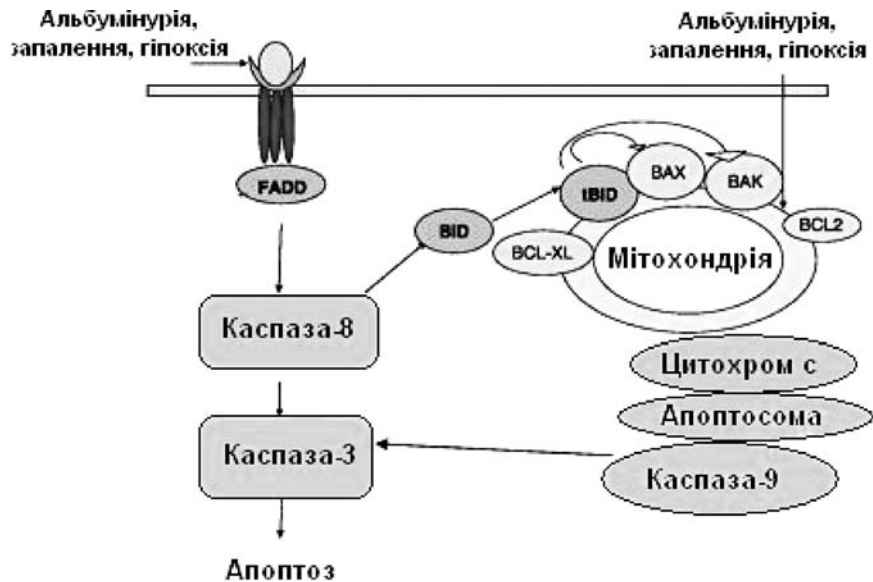


Рис. 4. Схема сигнальних шляхів розвитку апоптозу при ХГН у дітей

но тубулярних клітин [15,17], що відіграє окрему роль у патогенезі прогресування втрати функції нирок при ХГН. Активованій у проксимально тубулярних клітинах апоптоз призводить до тубулярної атрофії, виникнення атубулярних клубочків [17].

Таким чином, причиною розвитку апоптозу при хронічному гломерулонефриті у дітей є активація внутрішнього сигнального шляху апоптозу, ефектором якого є проапоптозний фактор Вах та зовнішнього шляху, в якому ефектором є каспаза-8 (рис. 4).

Отримані дані дають можливість розробки терапевтичних впливів, що можуть безпосередньо та опосередковано корегувати апоптоз, з використанням засобів, які регулюють запалення (кортикостероїди, імуносупресори, антиоксиданти) та забезпечують інгібування активуючого впливу запалення на проапоптозні фактори; інгібіторів АПФ як факторів зниження альбумінурії, фіброзу, що є індукторами апоптозу.

Висновки

1. Показано, що розвиток апоптозу при ХГН у дітей пов'язаний з активацією внутрішнього сигнального та зовнішнього сигнальних шляхів, ефекторами яких є, відповідно, Вах та каспаза-8.

2. Виявлено залежність зміни експресії проапоптозного фактора Вах та топічної локалізації експресії від ступеня патоморфологічних порушень при фокально-сегментарному гломерулосклерозі.

3. Показано активацію каспази-8 у всіх дітей із ХГН, що свідчить про її участь як ефектора зовнішнього сигнального шляху апоптозу на всіх стадіях прогресування ХГН у дітей незалежно від ступеня порушення функції нирок.

Перспективи подальших досліджень

Дослідження молекулярних механізмів та патоморфологічних субстратів апоптозо-залежних шляхів порушення функції нирок при ХГН є основою для створення нових терапевтичних підходів спрямованих на зниження протеїнурії, модуляторів молекулярних процесів, пов'язаних з запаленням.

Література. 1. Chevalier R. Generation and Evolution of Atubular Glomeruli in the Progression of Renal Disorders / R. Chevalier, M. Forbes // J Am Soc Nephrol. – 2008. – 19: 197-206. 2. Eddy A.A. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria / A.A. Eddy, C.M. Giachelli // Kidney Int. – 1995. – 47: 1546-1557. 3. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / S. Elmore // Toxicol Pathol. – 2007. – 35(4): 495-516. 4. Erkan E. Albumin overload induces apoptosis in LLC-PK(1) cells / E. Erkan, M. De Leon, P. Devarajan // Am J Physiol Renal Physiol. – 2001. – 280: 1107-1114. 5. Cory S. Nature Reviews Cancer / S. Cory, J.M. Adams // The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. – 2002. – 2: 647-656. 6. Fine L.G. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney disease: from hypothesis to novel therapeutics / L.G. Fine, J.T. Norman // Kidney Int. – 2008. – 74: 867-872. 7. Hughesa J. Apoptosis in glomerulonephritis / J. Hughesa, J.S. Savillb // Current Opinion in Nephrology and Hypertension. – 2005. – 14: 389-395. 8. Iseki K. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease / K. Iseki K, Y. Ikemiya, C. Iseki [et al.] // Kidney Int. – 2003. – 63: 1468-1474. 9. Makino H. Apoptosis and extracellular matrix-cell interactions in kidney disease / H. Makino, H. Sugiyama, N. Kashihara // Kidney Int. – 2000. – 58 (Suppl 77): 67-75. 10. Zakeri Z. Cell death: history and future / Z. Zakeri, R.A. Lockshin // Adv. Exp. Med. Biol. – 2008. – 615: 1-11. 11. Gajkowska B. Translocation of Bax and Bid to mitochondria, endoplasmic reticulum and nuclear envelope: possible control points in apoptosis / B. Gajkowska, U. Wojewodzka, J. Gajda // J Mol Histol 35: 11-19, 2004. 12. Taylor R.C. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level / R.C. Taylor, S.P. Cullen, S.J. Martin // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. 9(3): 231-41. 13. Theilig F. Spread of glomerular to tubulointerstitial disease with a focus on proteinuria / F. Theilig // Annals of Anatomy. – 2010. – V. 192. – P. 125-132. 14. Wornle M. Effects of chemokines on proliferation and apoptosis of human mesangial cells / M. Wornle, H. Schmid, M. Merkle [et al.] // BMC Nephrol. –

2004. - 5:8. 15. Zoja C. Proteinuria and Phenotypic Change of Proximal Tubular Cells / C. Zoja, M. Morigi, G. Remuzzi // J Am Soc Nephrol. - 2003. - 14: 36-41.

**ЭФФЕКТОРЫ АПОПТОЗА
В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО
ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА У ДЕТЕЙ**

Е. А. Булака

Резюме. Показано, что развитие апоптоза при хроническом гломерулонефрите у детей зависит от активации внешнего сигнального пути, эффектором которого есть каспаза-8 и внутреннего митохондриального сигнального пути, о чем свидетельствует повышение активности проапоптотного фактора Bax. Выявлена зависимость экспрессии и локализации Bax от степени патологических нарушений при фокально-сегментарном гломерулосклерозе. Полученные данные есть перспективными в плане усовершенствования лечения детей с хроническим гломерулонефритом с использованием терапевтических средств, которые могут прямо или косвенно влиять на апоптоз, в том числе, модуляторов воспаления (кортикостероиды, иммуносупрессоры, антиоксиданты), уменьшать фиброз, альбуминурию (ингибиторы АПФ).

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, прогрессирование, апоптоз, Bax, каспаза-8, воспаление.

**APOPTOTIC EFFECTORS IN CHRONIC
GLOMERULONEPHRITIS PROGRESSION
IN CHILDREN**

Ye. A. Burlaka

Abstract. It has been shown that the development of apoptosis in chronic glomerulonephritis in children depends on an activation of extrinsic signaling pathway, whose effector is caspase-8 and the intrinsic mitochondrial signaling pathway, evidenced by the increase in activity of pro-apoptotic factor Bax. The dependence of the expression and localization of Bax on the degree of pathological disorders in focal segmental glomerulosclerosis has been shown. The findings obtained are perspective in terms of improving treatment schemes for children with chronic glomerulonephritis using therapeutic agents that may directly or indirectly effect apoptosis, including tools that influence inflammation (corticosteroids, immunosuppressive agents, anti-oxidants) and reduce fibrosis, albuminuria (ACE inhibitors).

Keywords: chronic glomerulonephritis, progression, apoptosis, Bax, caspase-8.

Clin. and experim. pathol.- 2012.- Vol.11, №4 (40).-P.33-38.

Надійшла до редакції 07.02.2012

Рецензент – проф. Ю.С.Роговий

© Е. А. Булака, 2012