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

Є. А. Бурлака

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ
Каролінський інститут (м. Стокгольм, Швеція)

ГІПОКСИЧНІ ПОШКОДЖЕННЯ В ПРОГРЕСУВАННІ ХРОНІЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ НИРОК У ДІТЕЙ

Ключові слова: *хронічне захворювання нирок, прогресування, клітинна гіпоксія, O_2^-, запалення.*

Резюме. *Показано, що патогенез хронічного захворювання нирок (ХЗН) супроводжується формуванням клітинної гіпоксії. Виявлено залежність ступеня структурно-функціональних пошкоджень нирок, - фільтраційного бар'єра та гемодинамічних порушень, у дітей з ХЗН від рівня клітинної гіпоксії. Оцінка рівня процесів запалення при ХЗН за показниками активності запальних клітин, рівнів клітинної гіпоксії (HIF-1α) може бути використана як показник активності процесу та предикторів прогресування захворювання.*

Вступ

Хронічне захворювання нирок (ХЗН) є патологічним станом, пов'язаним з незворотнім пошкодженням нирок, яке може надалі прогресувати до термінальної стадії хронічного захворювання нирок (ТСХЗП). ТСХЗП є однією з основних проблем системи охорони здоров'я в усьому світі. ТСХЗП як кінцева стадія втрати функції нирок, пов'язана з високою частотою розвитку серцево-судинної патології, порушенням психосоматичного розвитку дітей, що серйозно впливає на якість життя і є причиною високого рівня смертності [1-3]. Важливість вивчення епідеміології, етіології і особливо патогенезу ХЗН визначається необхідністю удосконалення підходів до ранньої діагностики з метою запобігти або попередити прогресію захворювання, передбачити прогноз.

Запалення є сумісною реакцією судин та тканини у відповідь на вплив пошкоджуючих екзогенних та ендогенних стимулів, є результатом клітинної гіпоксії. Хронічне запалення при ХЗН характеризується низькою активністю (4), втратою ознак специфічності, що сприяє прогресуванню втрати функції нирок та розвитку системних органних ускладнень (4,5).

Адекватна відповідь організму забезпечується за рахунок гіпоксія-індукованого фактора (HIF-1, HIF-2), що активується при станах, пов'язаних з хронічним запаленням. За фізіологічних умов, адекватний рівень клітинної гіпоксії сприяє виживаності клітин, їх адаптації. У нирках присутні декілька ізоформ HIF. Зокрема, HIF-1α визначається в канальцях й інтерстиційних клітинах, в той час як HIF-2α ізоформа присутня в ендотеліальних та мезангіальних клітинах, фібробластах. Активація HIF за умов хронічної гіпоксії призводить до транскрипції чутливих генів, що кодують відповідні сигнальні фактори, в тому числі еритропоетина, фактора росту ендотелію судин (VEGF), гемоксигенази-1, синтази оксида азоту, циклооксигенази-2 та ін. (6).

Посилення процесів запалення відбувається за умов протеїнурії, що виникає в результаті пошкодження фільтраційного бар'єру при гломерулярних захворюваннях нирок, відбувається активація синтезу та виділення запальних медіаторів (7-9). Цьому сприяють й інші компоненти, що фільтруються, зокрема, такі потенційно токсичні білки як трансферин, IgG, компоненти комплемента (10).

Матеріал і методи

У ході дослідження обстежено 37 дітей віком 5-18 років з ХЗН, що перебували на стаціонарному лікуванні в Нефрологічному відділенні ДКЛ №7 м. Києва. Як групу контролю обстежено 12 здорових дітей. Усім дітям проведено загальноклінічне обстеження, що включало загальний аналіз крові та сечі, аналіз сечі за Нечипоренко, біохімічний аналіз крові, ультразвукове обстеження нирок, добове моніторування артерільного тиску. Стан функції нирок оцінювали шляхом розрахунку швидкості клубочкової фільтрації за формулою Шварца.

Матеріалом дослідження для оцінки рівнів HIF-1α слугувала плазма крові обстежених дітей. Плазму розводили в буфері (50 мМ Tris/HCl (pH 7.4), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5 мМ дитіотреітол, 0,5% деоксихлорат натрію, 1,5% NP-40, 1 мМ фенілметилсульфоніла флюорит) у співвідношенні 1:100. До зразка додавали інгібітори протеаз (Roche Diagnostics) у співвідношенні 1:1000 до кінцевого об'єму. Концентрацію загального білка

© *Є. А. Бурлака, 2012*

визначали методом Бредфорда з використанням набору "Bio-Rad для білкового аналізу" ("Bio-Rad", США).

Визначення рівнів ГІФ-1α в плазмі крові обстежених дітей проводили методом Western Blotting. Електрофорез проводили в 7,5% поліакриламідному гелі з наступним трансфером на полівінілден-дифлюоридні мембрани. Блокування мембран проводили в 5% знежиреному молоці на TBS-T (136 мМ NaCl, 10 мМ Tris, 0,05% Tween 20) з наступною інкубацією з первинним антитілами, - Mouse anti-Human HIF-1alfa Ab (BD Transduction Laboratories, 1:500) протягом 12 год при 4ЪС. Як вторинні антитіла використовували Anti-mouse horsredish peroxidase Ab (GE Healthcare) в концентрації 1:3000 з інкубуванням протягом 1 год при кімнатній температурі. Мембрани відмивалися TBS-T, після чого візуалізація білків проводилася хемілюмінісцентно з використанням хеілюмінісцентного субстрату ECL (GE Healthcare).

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0. Для порівняння відмінностей груп використовували непараметричнй аналіз (Mann-Whitney test). Кореляційний зв'язок між вибірками розраховували за коефіцієнтом рангової кореляції Спірмена (*r*). Величини представлені як Mean±SEM. P<0,05 вважали статистично достовірним.

Обговорення результатів дослідження

Раніше нами було показано, що при артеріальній гіпертензії відбувається активація внутрішньоклітинного генерування РФК та оксиду азоту (NO) та розвиток неспецифічного запалення, що супроводжується вторинними порушеннями, що пов'зані з активацією ефекторів – вазоконстрикторів, ремодуляторів міжклітинного матрикса (ендотелін-1, матриксні металопротеїнази) (11,12).

Нами досліджені рівні запальної активації нейтрофілів крові дітей з хронічним гломерулонефритом за рівнем швидкості генерування супероксидних радикал-аніонів (O_2^{-}). Виявлено, що в дітей з хронічним гломерулонефритом рівні показника значно перевищують показник групи контролю. При цьому, швидкість генерування O_2^{-} мала залежність від ступеня порушення функції нирок. У дітей з ХЗН I ст. показник становив 1,55±0,7 нмоль/1·10^3 клітин·хв, при II-III ст. ХЗН – 2,79±0,22 нмоль/1·10^3 клітин·хв (рВ0,01), в групі контроля - 0,33±0,1 нмоль/1·10^3 клітин·хв (рис.1).

Заплення при гломерулярних захворюваннях нирок ініціюється та супроводжується зростанням генерування РФК та NO, що в подальшому викликає зростання рівнів синтезу прозапальних цитокінів, - інтерлейкін-1I (ІЛ-1I), фактор некрозу пухлин-α (TNF-α), ІЛ-6 та ін. гломерулярними ендотеліальними клітинами, макрофагами. Вищевказані молекули виступають як тригери для клітинних реакцій в зоні запалення, зокрема для інфільтрації макрофагів, активації мезангіальних клітин. У результаті цього пошкодження клубочків посилюється (13-18).

Утворені супероксидні радикали ініціюють пошкодження в результаті активації утворення вторинних РФК. Ферменти мембран мітохондрій чутливі до окисних пошкоджень, а порушення їх функціонування проявляється дефіцитом синтезу АТФ, що посилює ступінь клітинної гіпоксії, зростання рівнів РФК, порушення транспорту кальція, зміни проникності мітохондріальних транзиторних пор, призводить до активації різних клітинних месенджерів (10,15,16).

Нами проведено дослідження рівнів гіпоксичних пошкошкоджень в організмі дітей з хронічним гломерулонефритом на основі визначення рівнів HIF-1α в плазмі крові обстежених пацієнтів.

Отримані результати свідчать про наявність високих рівнів показника в усіх дітей з ХЗН порівняно з групою контроля. Крім того, показано, що стадія порушення функції нирок залежить від рівня HIF-1α. Так, у дітей з хронічним гломерулонефритом та ХЗН I ст. рівень HIF-1α перевищував показник групи контролю на 28,59% (p<0,01). При порівнянні рівнів ГІФ-1α в плазмі крові у дітей з хронічним гломерулонефритом ХЗН I ст. та хронічним гломерулонерфитом ХЗН II-III ст., зареєстровано, що показник є вищим в групі з ХЗН II-III ст. (128,59% проти 141,25%, відповідно) (p<0,01) (рис. 2).

За методикою Шварца усім обстеженим дітям було проведено розрахунок рівня швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ). Так, діти з ХЗН II-III ст. мали знижений рівень швидкості клубочкової фільтрації. Середнє значення ШКФ у даній групі становило 60,67±4,45 мл/мин на 1,73 м^2. У групі обстежених з ХЗН I ст. ШКФ становила 147,8±12,83 мл/мин на 1,73 м^2, що свідчить про гіперфільтрацію, як ознаку первинних гіпоксично-індукованих гемодинамічних розладів на рівні нефрона.

В результаті проведеного кореляційного аналізу в обстежених нами пацієнтів з ХЗН виявлено прямий позитивний кореляційний зв'язок між рівнями HIF-1α та рівнями протеїнурії (r=0,61, p<0,01) (рис.3). Отримані дані свідчать про безпосередню участь гіпоксичних пошкоджень у прогресуванні втрати функції нирок при ХЗН.

Клітинна гіпоксія є причиною посилення структурних та функціональних розладів нефрону, - порушення капілярного кровотоку, перитубулярного кровотоку внаслідок гломерулярних пошкоджень еферентних артеріол. В результаті останнього виникає неадекватність кровотоку в гломерулярному та тубулярному сегментах. Як ре-

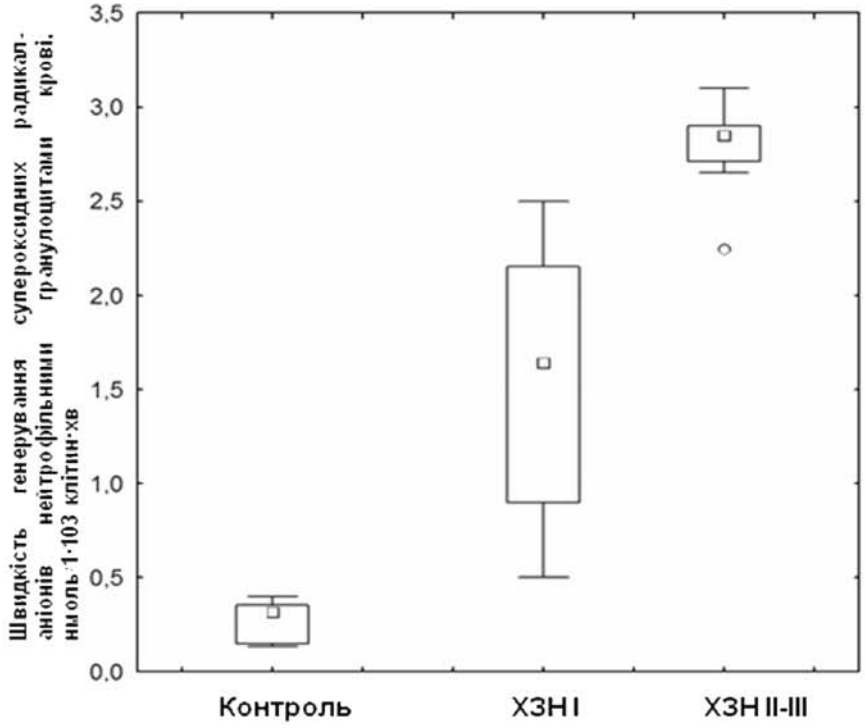
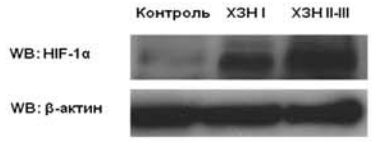


Рис. 1. Рівні запальної активації нейтрофільних гранулоцитів крові у дітей із хронічним гломерулонефритом

А)



Б)

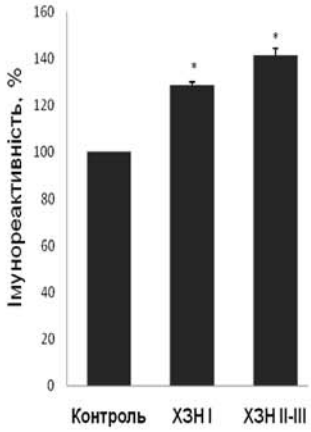


Рис. 2. Рівні гіпоксичних пошкоджень у дітей із ХЗН
А) – рівні ГІФ-1α у дітей з ХЗН. Б) – імунореактивність HIF-1α (імунореактивність у групі контролю прийнята за 100%). * - p<0,01

зультат судинних розладів на рівні нефрону, хронічна гіпоксія прогресує. Цьому сприяють посилене споживання кисню в процесі гіперфільтрації та зниження дифузії кисню в результаті експансії зовнішньоклітинного матрикса. Крім пошкоджень клубочків, клітинна гіпоксія забезпечує тубулоінтерстиційні пошкодження. Найбільш чутливими при цьому є проксимально-тубулярні клітини. Останні підлягають процесу епітуліально-мезенхімальної трансформації, перетворюю-

чись на фібробласти. Індуковані гіпоксією тубулоінтерстиційні пошкодження закінчуються інтерстиційним фіброзом, пошкодженням перитубулярних капілярів. Кінцевим результатом описаних процесів є прогресування порушення функції нирок у результаті пошкодження фільтраційного бар'єра, тубулоінтерстиційних порушень.

Висновки

1. Ступінь структурно-функціональних пошкоджень нирок у дітей з ХЗН (фільтраційний бар'єр, гемодинамічні порушення на рівні нефрона) залежить від рівнів клітинної гіпоксії.

2. Оцінка запалення при ХЗН за показниками активності запальних клітин, рівнів клітинної гіпоксії може бути використана як показники активності процесу та предикторів прогресування.

Перспективи подальших досліджень

Отримані дані є підгрунтям для створення удосконалених схем лікування. Зокрема, застосування комплексу засобів, що впливають на запалення (кортикостероїди, імуносупресори) та модуляторів процесів гіпоксії та окисної активації (антиоксиданти) є обгрунтованим в лікуванні ХЗН.

Література. 1. *Greenbaum L.A.* Current advances in chronic kidney disease in children: growth, cardiovascular, and neurocognitive risk factors / L.A. Greenbaum, B.A. Warady, S.L. Furth // Semin Nephrol. – 2009. – V.29. – P. 425–434 2. *Kriz W.* Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models / W. Kriz, M. Le Hir // Kidney Int. - 2007. - V. 67, No. 2. – P. 404–419. 3. *Theilig F.* Spread of glomerular to tubulointerstitial disease with a focus on proteinuria / F. Theilig // Annals of Anatomy. - 2010. –V.. 192. – P. 125–132. 4. *Silverstein D.M.* Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease / D.M. Silverstein // Pediatr Nephrol. - 2009. – V. 24. – P. 1445–1452. 5. *Costa E.* Inflammation, T-Cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy / E. Costa, M. Lima, J.M. Alves [et al.] // J Clin Immunol. - 2008. – V. 28. – P. 268–275. 6. *Yu X.* Transient hypoxia-inducible factor activation in rat renal ablation and reduced fibrosis with L-mimosine / X. Yu, Y. Fang, X. Ding [et al.] // Nephrology (Carlton). - 2011, July 20. – on-line published**.** 7. *Ola M.S.* Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis / M.S. Ola, M. Nawaz, H. Ahsan // Mol Cell Biochem. - 2011 (published on-line). 8. *Morigi M.* Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H(2)O(2) through a PKC-dependent pathway / M. Morigi, D. Macconi, C. Zoja [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. - 2002. – V. 13, No. 5. – P. 1179–1189. 9. *Schreiner G.F.* Renal toxicity of albumin and other lipoproteins/ G.F. Schreiner // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. - 1992. – V. 4, No. 4. – P. 369–373. 10. *Buelli S.* Protein load impairs factor H binding promoting complement-dependent dysfunction of proximal tubular cells / S. Buelli, M. Abbate, M. Morigi [et al.] // Kidney Int. - 2009. – V. 75, No. 10. – P. 1050–1059. 11.*Майданник В.Г.* Захист геному дітей і підлітків з артеріальною гіпертензією від окисних модифікацій/ В.Г. Майданник, Є.А. Бурлака, Є.П. Сидорик [та ін.] // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2007. - № 6. – С. 5-8. 12.Майданник В.Г. Корекція мітохондріального окисного стресу при первинній артеріальній гіпертензії у дітей / В.Г. Майданник, М.В. Хайтович, Є.А. Бурлака [та ін.] // Науковий вісник Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. – 2008. – Т.1, №16. – С. 161-166. 13.Kriz W. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models / W. Kriz, M. Le, H. Hir // Kidney Int. - 2007. - V. 67, No. 2. – P. 404-419. 14.Morigi M. Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H_2O_2 through a PKC-dependent pathway / M. Morigi, D. Macconi, C. Zoja [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. - 2002. – V. 13, No. 5. – P. 1179-1189. 15.Morrissey J. Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy / J. Morrissey, S. Ishidoya, R. McCracken [et al.] // J Am Sot Nephrol. – 1996. – V.7. – P. 2202-2212. 16.Rosenberger C. Up-regulation of HIF in experimental acute renal failure: Evidence for a protective transcriptional response to hypoxia/ C. Rosenberger, S.N. Heyman, S. Rosen [et al.] // Kidney Int. – 2005. – V. 67. – P. 531-542. 17.Greijer A.E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis / A.E. Greijer, L.E. Vanderwall // J Clin Pathol. – 2007. – V. 57. – P. 1009-1014.

ГИПОКСИЧЕСКИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОЧЕК У ДЕТЕЙ

Е. А. Бурлака

Резюме. Показано, что патогенез хронического заболевания почек (ХЗП) сопровождается формированием клеточной гипоксии. Обнаружена зависимость степени структурно-функциональных повреждений почек - фильтрационного барьера и гемодинамических нарушений нефрона, у детей с ХЗП от уровня клеточной гипоксии. Оценка активности уровня воспаления при ХЗП по показателям активности воспалительных клеток, уровней клеточной гипоксии (ГИФ-1α) может быть использована в качестве показателей активности процесса и предикторов прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: хроническое заболевание почек, прогрессирование, клеточная гипоксия, воспаление.

HYPOXIC INJURIES IN PROGRESSION OF CHRONIC KIDNEY DISEASE IN CHILDREN

Ye. A. Burlaka

Abstract. We have shown that pathogenesis of Chronic Kidney Disease (CKD) is accompanied by the formation of cellular hypoxia. It has been revealed that the severity of structural and functional kidney damage, - filtration barrier and hemodynamic disorders in nephron in children with CKD are determined by levels of cellular hypoxia. Assessment of activity level of inflammation in CKD in terms of activity of inflammatory cells, cellular levels of hypoxia (HIF-1α) can be used as indicators of activity level course and predictors of disease progression.

Keywords: chronic kidney disease, progression, cellular hypoxia, inflammation.

O. O. Bohomolets National Medical University (Kyiv)
Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)

Clin. and experim. pathol.- 2012.- Vol.11, №1 (39).-P.25-28.

Надійшла до редакції 07.02.2012
Рецензент – проф. Ю. Є. Роговий
© Є. А. Бурлака, 2012