

©Майданник В.Г., Бурлака Є.А., Багдасарова І.В., Фоміна С.П., Непомнящий В.М., 2014

УДК 616.611-002-036.2-053.2:616-001.8

МАЙДАННИК В.Г.¹, БУРЛАКА Є.А.^{1,2}, БАГДАСАРОВА І.В.³,
ФОМІНА С.П.³, НЕПОМНЯЩИЙ В.М.³РОЛЬ ГИПОКСИЯ-ИНДУКОВАНОВОГО АПОПТОЗУ В ПРОГРЕСУВАННІ ХРОНІЧНОГО
ГЛОМЕРУЛОНЕРИТУ У ДІТЕЙMAIDANNYK V.G.¹, BURLAKA E.A.^{1,2}, BAGDASAROVA I.V.³, FOMINA S.P.³, NEPOMNYASCHIY V.M.³ROLE OF HYPOXIA-INDUCED APOPTOSIS IN CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS
PROGRESSION IN CHILDREN¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ²Каролінський інститут, Стокгольм, Швеція³ДУ «Інститут нефрології НАМН України», Київ¹National O.O. Bogomolets Medical University, Kyiv²Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden³SI «Institute of Nephrology NAMS of Ukraine», Kyiv**Ключевые слова:** хронический гломерулонефрит, нефротический синдром, прогрессирующее, клеточная гипоксия, апоптоз, Bcl-xL.**Keywords:** chronic glomerulonephritis, nephrotic syndrome, progression, cellular hypoxia, apoptosis, Bcl-xL.**Резюме.** Цель работы. Изучить показатели клеточной гипоксии и апоптоза у детей с нефротической формой хронического гломерулонефрита.

Материалы и методы. Обследовано 52 пациента с активной стадией нефротической формы хронического гломерулонефрита, которые были разделены на группы Хронического заболевания почек (ХЗП) на основании уровня клубочковой фильтрации (КФ). Определение уровня гипоксия-индуцированного фактора (hypoxia-induced factor – HIF) и антиапоптозного фактора Bcl-xL в сыворотке крови проведено и использованием методики western blotting (wb) и иммуногистохимически на материале биопсии почек. Получения изображений произведено с помощью конфокальной лазерной микроскопии.

Результаты. Установлено, что развитие заболевания сопровождается повышением уровня индуцированного гипоксией фактора HIF-1 α и снижением активности фактора системы антиапоптозной защиты Bcl-xL (в плазме крови и на материале биопсий почек). Определена зависимость между степенью роста уровней HIF-1 α и наличием нарушения функции почек. При хроническом заболевании почек (ХЗП I ст.) уровень HIF-1 α составил 128.6 \pm 2.3% (P<0.01 по сравнению с Контролем), при ХЗП II-III ст. – 141.3 \pm 1.9% (P<0.01 по сравнению с Контролем и группой с сохраненной КФ). Степень снижения антиапоптозной защиты при ХЗП также зависел от наличия нарушения функции почек. При сохраненной функции (ХЗП I ст.) экспрессия Bcl-xL была снижена до 75.1 \pm 2.2%, а при замедлении КФ (ХЗП II-III ст.) сопровождалось уменьшением уровня показателя до 60.1 \pm 1.8% (P<0.01 и P<0.001, соответственно, по сравнению с группой Контроля). Степень выявленных изменений достоверно зависит от интенсивности протеинурии и наличия нарушения фильтрационной функции почек.

Заключение: оценка изученных параметров может быть использована в качестве предикторов неблагоприятного течения нефротической формы хронического гломерулонефрита.

Summary. Aim of the study: to study the indicators of cellular hypoxia and apoptosis in pediatric patients with nephritic type of chronic glomerulonephritis.

Material and methods: 52 patients with active stage of nephrotic type of Chronic glomerulonephritis were inspected. All patients were divided into groups of Chronic Kidney Disease (CKD) by the level of glomerular filtration rate (GFR). Detection of the hypoxia-induced factor (HIF) and antiapoptotic factor Bcl-xL in serum performed using Western Blotting assay and immunohistochemically on material of kidney biopsies. Imaging was done using confocal laser microscopy.

Results: it has been found that the disease course is accompanied by increased levels of hypoxia-induced factor HIF-1 α and decreased expression of antiapoptotic factor Bcl-xL (in plasma and on biopsies). Detected changes significantly depended on the degree of proteinuria and declining of glomerular filtration rate. Dependence between the levels of hypoxia-induced damages and level of kidney function impairment was documented. In children with Chronic Kidney Disease (SKD I st.) HIF-1 α was at level 128.6 \pm 2.3% (P<0.01, compared to Control group), in children with CKD II-III st. – 141.3 \pm 1.9% (P<0.01, compared to Control group and CKD I st.). Level of antiapoptotic defense in children with nephrotic type of Chronic glomerulonephritis was related to the level of kidney function impairment as well. In group of

Бурлака Євгенія Анатоліївна
evgenija.burlaka@rambler.ru

patient with CKD I st. Bcl-xL expression was down-regulated to $75.1 \pm 2.2\%$, in group with CKD II-III st. – to $60.1 \pm 1.8\%$ ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, compared to Control group, respectively). The level of evaluated changes has a dependence on levels of proteinuria and kidney function impairment.

Conclusion. Studied parameters might be used as predictors of unfavorable disease course.

ВСТУП. Хронічний гломерулонефрит (ХГН) є основною причиною розвитку хронічного захворювання нирок (ХЗН) в дитячій нефрології. Механізми прогресування ХЗН, а ХГН зокрема, залишаються сьогодні ще недостатньо вивченими [2]. ХГН відносять до групи імунозапальних захворювань, які характеризуються, крім неуточної етіології та схожими ланками патогенезу з імунорегуляторним дисбалансом, гістологічною гетерогенністю, непередбачуваним перебігом та проблемним прогнозом через можливість прогресування до термінальної стадії хронічної ниркової недостатності (тХНН) [13]. Патологічні основи компенсаторних процесів та прогресування захворювання дуже подібні і забезпечуються на клітинному рівні проліферацією клітин (гломерулярних, тубулярних, інтерстиціальних). Однак при патології нирок порушення регуляції проліферативних процесів відбувається паралельно зі зростанням рівнів загибелі клітин за механізмом апоптозу, що призводить до незворотних гістологічних змін (розвитку гломерулосклероза, тубулярних кіст, інтерстиціального фіброзу) [5, 11].

Апоптоз є запрограмованою смертю клітини, який має місце при захворюваннях нирок та відіграє важливу роль в їх фізіології. Позитивні функції апоптозу в нирках забезпечують ремоделювання тканин і відновлення нормальної структури та функції нефрона, видалення пошкоджених клітин в області запалення або гіперклітинності клубочків. Шкідливі ефекти апоптозу полягають в тому, що в результаті його активації відбувається втрата великої кількості клітин нирок під час або після ниркового запалення, утворення рубців, втрата функції нирок [1, 4].

HIF-1 α є одним з індукторів апоптозу [12]. В цілому, контроль останнього є складним багатоступеневим процесом, який залежить від балансу активності про- та антиапоптозних факторів, в якому важливу роль відіграє родина Bcl [9]. До білків-контролерів апоптозу відносять продукти експресії антиапоптозних генів Bcl-xL, які попереджуючи активацію каспаз, гальмують каскад апоптичного процесу [3, 9].

МЕТА РОБОТИ: дослідити показники хронічної гіпоксії та факторів системи контролю апоптозу при прогресуванні ХГН у дітей.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ. Дизайн дослідження – **одномоментне** (cross-sectional study), об'єкт – 52 пацієнтів (віком від 5 до 18 років) з активною стадією нефротичної форми ХГН, які обстежились в клініці дитячої нефрології ДУ «Інститут нефрології АМН України» (клінічна база – ДКЛ №7 м. Києва) в 2009-2013 роках.

Діагноз встановлено за наявності клініко-лабораторного симптомокомплексу нефротичного

синдрому (протеїнурія >3 г/доба, гіпоальбумінемія <25 г/л, гіперхолестеринемія >6.5 ммоль/л, набряків). Тривалість захворювання у обстежених дітей складала від 1 до 6 років. Порушення функції нирок оцінювалось за рівнем зниження швидкості клубочкової фільтрації (КФ), що розраховувалась за формулою Шварца.

Залежно від функції нирок хворі були розподілені на групи: ХЗН I (швидкість КФ ≥ 90 мл/хв/1.73 м²) – n=33, ХЗН II-III (швидкість КФ 30-89 мл/хв/1.73 м²) – n=19. Пацієнти з швидкістю КФ <30 мл/хв/1.73 м² були виключені з дослідження.

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 в крові хворих, які є маркерами клітинної гіпоксії та хронічного запалення.

Визначено рівень гіпоксія-індукованого фактору (hypoxia-induced factor – HIF), його ізоформи 1 α , в плазмі та антиапоптозного фактора Bcl-xL в нейтрофілах крові з використанням методики western blotting (wb).

Для підготовки зразків плазми хворих розводили в буфері (50 мМ Tris/HCl (pH 7.4), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5 мМ дитіотреїтол, 0,5% деоксихлорат натрію, 1,5% NP-40, 1 мМ фенолметилсульфоніла 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 плазми для оцінки рівнів HIF-1 α та Bcl-xL проводили в 12.5% поліакриламідному гелі з наступним трансфером на полівінілден-дифлюоридні мембрани та блокуванням мембран в 5% знежиреному молоці на TBS-T (136 мМ NaCl, 10 мМ Tris, 0,05% Tween 20). Інкубацію з первинним антитілами (Mouse anti-Human HIF-1 α Ab, BD Transduction Laboratories, та Mouse anti-Bcl-xL Ab, Cell Signaling) у співвідношенні 1:500 проводили протягом 12 годин при температурі 4 С. В якості вторинних антитіл використовували Anti-mouse horseradish peroxidase Ab (GE Healthcare) в концентрації 1:3000 з інкубуванням протягом 1 години при кімнатній температурі. Після відмивання мембран за допомогою TBS-T проведено візуалізацію білків з використанням хемілюмінесцентного субстрату (ECL, GE Healthcare, UK). Для контролю об'єму зразків, на-

несених в гель при електрофорезі, використано β -актин – білок цитоскелету («золотий стандарт» wb аналізу).

Імуногістохімічне визначення рівня фактора системи контролю апоптозу (Bcl-xL) визначали на біотичному матеріалі дітей з морфологічною формою хронічного гломерулонефриту фокальний сегментарний гломерулосклероз з ознаками запалення. Зрізи тканини нирок були відмиті від парафіну, дегідратовані. В якості первинних антитіл використовували поліклональні анти-Bcl-xL (розведення 1:200). В якості вторинних флуоресцеїн вмісних антитіл використовували Alexa 488 (Invitrogen, USA, розведення 1:500). Ядра клітин візуалізувались за допомогою 4,6-діаміно-2-фенілндолу (DAPI, 1,5 мг/мл), що додавався з фосфатним буфером при останньому відмиванні зрізів. Перед мікроскопією скельця з клітинами покривались Immu-Mount (Thermo Shandon, Midland, Canada).

Отримання знімків проводилась з використанням Zeiss LSM 510 інвертованого скануючого лазерного конфокального мікроскопа з використанням $\times 40/1.4$ N.A. олійно-імерсійного об'єктива. Знімки були опрацьовані з використанням програмного забезпечення Zeiss. Оптична товщина зрізу становила 1-2 мкм.

Контрольні показники були отримані при обстеженні 19 умовно здорових дітей (надалі – «Контроль»). Матеріал опрацьовано з використанням методів варіаційної статистики (STATISTICA 6.0) та непараметричних статистичних підходів (Mann-Whitney test). Результати представлено як Mean \pm SE, статистично достовірним вважався рівень $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Вивчення гіпоксичних пошкоджень при ХГН у дітей за рівнем HIF-1 α в плазмі крові хворих показало достовірне зростання досліджених параметрів в порівнянні з групою Контролю (рис. 1).

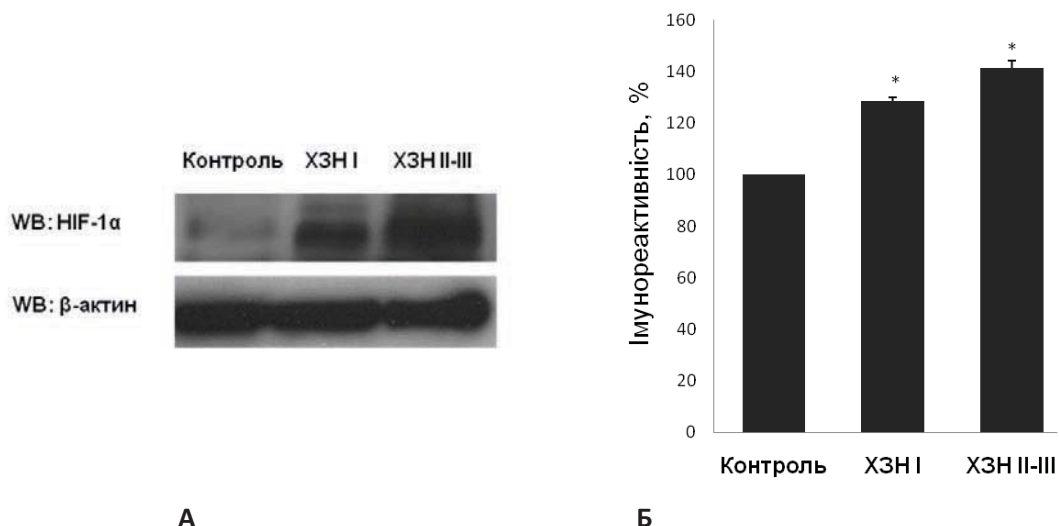


Рис. 1. Рівні HIF-1 α в плазмі крові хворих на ХГН та в Контролі: А – рівні HIF-1 α ; Б – імунореактивність HIF-1 α ; *відмінності достовірні. WB аналіз.

Крім того, між ступенем росту HIF-1 α та наявністю порушення функції нирок виявлена залежність: гіпоксичні порушення зростали при зменшенні швидкості КФ - якщо при ХЗН I ст. рівень HIF-1 α становив 128.6 \pm 2.3% ($P < 0.01$ в порівнянні з Контролем), то при ХЗН II-III ст. – 141.3 \pm 1.9% ($p < 0.01$ в порівнянні з Контролем та групою зі збереженою КФ).

Індивідуальний аналіз рівню HIF-1 α плазми та добової протеїнурії у хворих визначив наявність прямого позитивного кореляційного зв'язку ($r = 0.61$, $p < 0.01$) (рис. 2). Останнє свідчить про залежність рівня хронічної гіпоксії від ступеня пошкодження фільтраційного бар'єру нирок та підтверджує безпосередню участь гіпоксичних пошкоджень в прогресуванні ХГН.

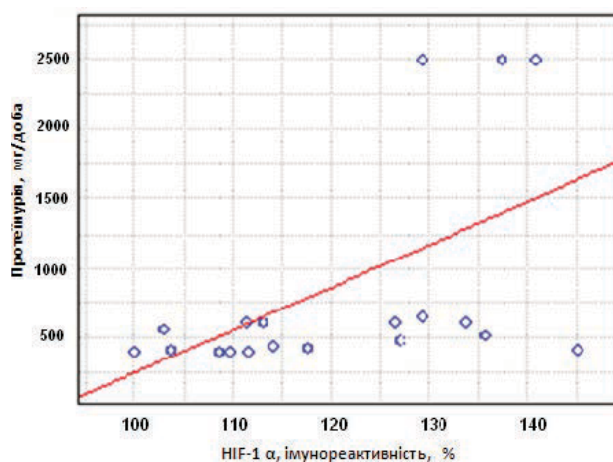


Рис. 2. Взаємозв'язок рівня HIF-1 α плазми та добової протеїнурії у дітей з ХГН.

Дослідження стану антиапоптозного захисту при ХГН у дітей виявило значне зниження рівню експресії фактора Bcl-xL в плазмі крові (рис. 3).

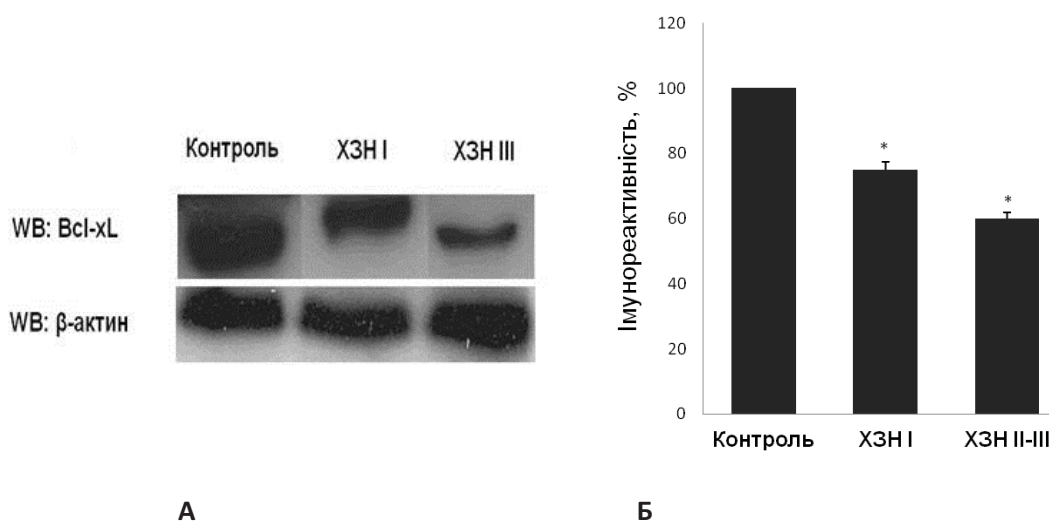


Рис. 3. Рівні антиапоптозного захисту у дітей з ХГН та в Контролі: А – рівні Bcl-xL; Б – імунореактивність Bcl-xL; *відмінності достовірні.

При цьому, ступінь зниження антиапоптозного захисту при ХГН залежав від наявності порушення функції нирок. Так, при збереженій функції (ХЗН I ст.) експресію Bcl-xL було знижено до $75.1 \pm 2.2\%$, а уповільнення КФ (ХЗН II-III ст.) супроводжувалось зменшенням рівня показника до $60.1 \pm 1.8\%$ ($P < 0.01$ та $P < 0.001$, відповідно, в порівнянні з групою Контролю) (див. рис. 3).

Результати проведеного аналізу рівнів антиапоптозного фактора Bcl-xL в зрізах біопсійного матеріалу нирок дітей з морфологічною формою хронічного гломерулонефриту фокально-сегментарний

гломерулосклероз з ознаками запалення виявив наявність певного рівня Bcl-xL як в клубочку так і в тубуло-інтерстиційному сегменті. При цьому, вищий рівень імуносигналу був зафіксований в тубуло-інтерстиційному сегменті порівняно з клубочком з 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 високий рівень імуносигналу Bcl-xL локалізуються в оточуючому тубуло-інтерстиційному сегменті при практично повній відсутності в клубочку ($19,57 \pm 1,02$ відн. од. проти $6,81 \pm 0,31$ відн. од., $p < 0,01$) (рис. 4).

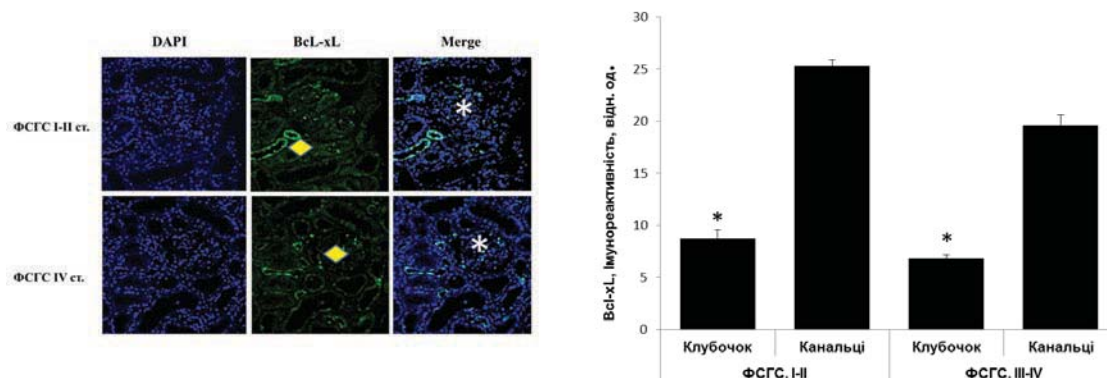


Рис. 4. Топічна локалізація рівнів антиапоптозного фактора Bcl-xL при нефротичній формі ХГН.

Примітка: DAPI – візуалізація ядер, Bcl-xL – імуносигнал Bcl-xL в тканині нирки, Merge – сумісне зображення, * - клубочок, ♦ - канальці.

Отримані результати підтверджують активну участь в патогенезі ХГН як хронічної гіпоксії і апоптозу. При цьому, наростання рівнів гіпоксичних пошкоджень (за вмістом HIF-1 α плазми) та активації апоптозу (за ступенем зниження експресії антиапоптозного фактора Bcl-xL) більш суттєво

змінюються при порушенні фільтраційної функції нирок.

Контроль і регулювання сигнального шляху апоптозу відбувається за участю білків родини Bcl-2. Bcl-2 приймає участь в 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, Bcl, Bk. Зрушення балансу активності факторів даної родини в ту чи іншу сторону призводить до зниження чи зростання рівнів апоптозу, що є патологією [3, 9].

Дисбаланс між процесом загибелі та проліферації клітин призводить до порушень того чи іншого характеру в структурі та функціонуванні нирок. Наприклад, переважання процесів проліферації клітин призводить до надмірного їх накопичення, - неоплазії, що є характерним для проліферативних форм гломерулонефриту. Зростання рівнів загибелі клітин, зокрема за рахунок апоптозу, є причиною незворотності втрати тих чи інших функцій за рахунок нездатності клітин до відновлення [7].

Основними механізмами дії антиапоптозних факторів родини Bcl-2 є наступні. Перший з них реалізується за рахунок інгібування прокаспаз в апоптосомі. При цьому Bcl-xL інгібує комплекс, утворений каспазою-9, Араф-1 і цитохромом С, що в кінцевому результаті запобігає активації каспази-3. Другий сценарій полягає в закритті VDAC і запобігання виходу мітохондріальних апоптогенних факторів, таких як цитохрому С і АІФ в цитоплазму [3,9]. Обидва механізми функціонують в стані функціональної недостатності при нефротичній формі хронічного гломерулонефриту.

Апоптоз при протеїнуричних захворюваннях нирок є результатом запально-асоційованих процесів (внутрішньоклітинна гіпоксія) та безпосереднього впливу білка. Активованій в проксимально тубулярних клітинах апоптоз призводить до тубулярної атрофії, виникнення атубулярних клубочків [6-8,14]. Наявність атубулярних клубочків визначає стан зміни функції нирок з однієї сторони, та прогресування тубулоінтерстиційних пошкоджень, з іншої [7, 8, 10, 14].

ВИСНОВКИ. Таким чином, показано, що прогресування гломерулосклерозу при нефротичній формі хронічного гломерулонефриту супроводжується гіпоксія-індукованим зниженням рівня антиапоптозного фактора Bcl-xL. Виявлено, залежність топичності рівнів Bcl-xL від ступеня ФСГС, що свідчить про етапність розвитку гломерулярних та тубуло-інтерстиційних пошкоджень під впливом протеїнурії. Подальше дослідження молекулярних механізмів виникнення апоптозу при протеїнуричних захворюваннях нирок у дітей та створення підходів до їх корекції є перспективним напрямком з точки зору попередження та уповільнення пошкодження нирок.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Abbate M.* How does proteinuria cause progressive renal damage? / M. Abbate, C. Zoja, G. Remuzzi // J Am Soc Nephrol. - 2006. - V. 17. - P. 2974-2984.
2. *Bradley A.W., Chadha V.* / Chronic kidney disease in children: the global perspective // Pediatr. Nephrol. - 2007. - V. 22. - P. 1999-2009.

3. *Brunelle J.K.* Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family / J.K. Brunelle, A. Letai // J Cell Sci. - 2009. - V. 122. - P. 437-441.
4. *Christman J.W., Blackwell T.S., Juurlink B.H.J.* 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. - V. 10. - P. 153-162.
5. *Djamali A.* Nox-2 is a modulator of fibrogenesis in kidney allografts / A. Djamali, A. Vidyasagar, M. Adulla, D. Hullett, S. Reese // Am. J. Transplant. - 2009. - V. 9. - P. 74-82.
6. *Eckardt K. U.* Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease / K. U. Eckardt, W. M. Bernhardt, A. Weidemann, C. Warnecke, C. Rosenberger, M. S. Wiesener, C. Willam // Kidney Int. Suppl. - 2005. - S. 46-51.
7. *Favaloro B.* Role of apoptosis in disease / B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio, V. De Laurenzi // Aging. - 2012. - V. 4 (5). - P. 330-349.
8. *Fine L. G.* Is there a common mechanism for the progression of different types of renal disease other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia / L. G. Fine, D. Bandyopadhyay, J. T. Norman // Kidney Int. - 2000. - V. 57. - Suppl. 75. - P. 22-26.
9. *Kinnally K.W.* A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis / K.W. Kinnally, B. Antonsson // Apoptosis. - 2007. - V. 12 (5). - P. 857-868.
10. *Nangaku M.* Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure / M. Nangaku // J. Am. Soc. Nephrol. - 2006. - V. 17. - P. 17-25.
11. *Okamura D. M.* Tipping the redox balance of oxidative stress in fibrogenic pathways in chronic kidney disease / D. M. Okamura, J. Himmelfarb // Pediatr. Nephrol. - 2009. - V. 24. - P. 2309-2319.
12. *Palm F.* Renal tubulointerstitial hypoxia: cause and consequence of kidney dysfunction / F. Palm, L. Nordquist // Clin. experiment. pharmacology and physiology. - 2011. - V. 38 (7). - P. 474-489.
13. *Remuzzi G.* Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes / G. Remuzzi, A. Benigni, A. Remuzzi // J. Clin. Invest. - 2006. - V. 116 (2). - P. 288-296.
14. *Theilig F.* Spread of glomerular to tubulointerstitial disease with a focus on proteinuria // Annals of Anatomy. - 2010. - V. 192. - P. 125-132.

Надійшла до редакції 10.11.2014

Прийнята до друку 25.11.2014