

О.В. Комарова, А.Г. Кучеренко, И.Е. Смирнов, А.Н. Цыгин

Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, Российская Федерация

Динамика содержания сывороточных маркеров апоптоза для оценки прогноза хронической болезни почек у детей

Contacts:

Komarova Olga Viktorovna, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Department of Nephrology at the Research Institute of Pediatrics SCCH FSBI, RAMS

Address: 2 Lomonosovskiy prospect, Build. 1, Moscow 199991, Tel.: (499) 134-13-08, e-mail: komarova@nczd.ru

Article received: 13.08.2013, Accepted for publication: 28.10.2013

Цель исследования: изучить динамику содержания ключевых сывороточных маркеров апоптоза sFas-рецептора и его лиганда sFas-L, цитохрома C и аннексина V у детей на разных стадиях хронической болезни почек (ХБП) для определения роли апоптоза клеток почечных структур в прогрессировании патологии почек. **Пациенты и методы:** в исследовании участвовали 68 детей с ХБП 1–3-й ст. в возрасте 3–17 лет. **Результаты:** отличные от нормальных значения sFas-R, sFas-L, аннексина V были обнаружены у детей на всех стадиях ХБП. Содержание цитохрома C достоверно превышало физиологический диапазон у детей с ХБП 1-й ст., однако имело тенденцию к повышению и на 2-й и 3-й ст. ХБП. При проведении дисперсионного анализа была установлена сильная корреляция между уровнем протеинурии и совокупностью всех 4 сывороточных показателей. У детей с неиммунной патологией без нарушения функций почек и у пациентов со 2-й ст. ХБП при сравнении сывороточных уровней маркеров апоптоза в условиях терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента и в отсутствие такого лечения установлено значимое повышение содержания sFas-R у пациентов без нефропротективной терапии. **Выводы:** в развитие и прогрессирование ХБП вовлечены как Fas-опосредованный, так и митохондриальный путь программируемой гибели гломерулярных и тубулярных клеточных структур почек. Применение с нефропротективной целью ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента уменьшает степень выраженности процессов апоптоза в них, в первую очередь ингибируя активность Fas-опосредованного механизма реализации.

Ключевые слова: дети, хроническая болезнь почек, апоптоз, Fas-опосредованный.

(Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (5): 104–107)

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая болезнь почек (ХБП) занимает особое место среди хронических неинфекционных болезней т.к. она широко распространена в популяции, связана с рез-

ким ухудшением качества жизни, высокой смертностью и в терминальной стадии приводит к необходимости применения дорогостоящих методов заместительной терапии: диализа и пересадки почки [1].

O.V. Komarova, A.G. Kucherenko, I.E. Smirnov, A.N. Tsygin

Scientific Centre of Children Health of RAMS, Moscow, Russian Federation

Dynamics of Concentration of Apoptosis Serum Markers in Assessment of Prognosis of Chronic Kidney Disease in Children

Aim: to investigate sFas-receptor and its ligand, sFas-L, cytochrome C and annexin V as the apoptotic markers in children with CKD to determine the renal cell apoptosis role in the progression of a renal disease. **Patients and methods:** 68 children with CKD 1–3 from 3 to 17 years were examined. **Results:** sFas-R, sFas-L, annexin V significant differed from normal value at all stages of CKD. Cytochrome C level was significantly higher than normal in children with CKD1. But tended to increase at and 2 and 3 stages correspondingly. Significant correlation was determined between proteinuria and the combination of all four markers. Comparing serum levels of apoptosis markers in children with non-immune disorders without renal dysfunction treated and iACE not treated and in patients with CKD-2 a significant excess of the level of sFas-R in patients without iACE therapy was found. **Conclusions:** Fas-mediated and mitochondrial programmed cell death are implicated in development and progression of CKD. ACE inhibitors reduced the severity of apoptosis, primarily by inhibiting the activity of its Fas-mediated pathway.

Key words: children, chronic kidney disease, apoptosis, Fas-induced.

(Voprosy sovremennoy pediatrii — Current Pediatrics. 2013; 12 (5): 104–107)

Под термином «хроническая болезнь почек» подразумевают наднозологическое понятие, объединяющее всех больных с сохраняющимися в течение 3 и более мес признаками повреждения ткани почек по данным лабораторных и инструментальных исследований и/или снижением их фильтрационной функции. В зависимости от скорости клубочковой фильтрации (СКФ) выделяют 5 стадий ХБП [2]. Именно потенциальная возможность утраты функции почек позволяет адекватно оценить вероятность и риски развития неблагоприятных исходов, что особенно важно у детей.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в раскрытии патогенетических звеньев прогрессирования хронических заболеваний почек [3]. При этом особое внимание уделяется т.н. неиммунным факторам прогрессирования. Считается доказанным, что неиммунное прогрессирование хронических заболеваний почек развивается вследствие сочетанного воздействия ряда патологических факторов, таких как:

- системная артериальная гипертензия;
- гемодинамические нарушения в почках, характеризующиеся повышенной перфузией почечных клубочков с развитием внутриклубочковой гипертензии и гиперфильтрации;
- появление и/или усугубление уже существующей протеинурии;
- усиление склеротических процессов в почках за счет стимуляции пролиферативных процессов [4].

Все указанные факторы находятся во взаимосвязи и являются звеньями одной патогенетической цепи формирования нефросклероза. При развитии гломерулярного и интерстициального склероза, которые в значительной мере обуславливают прогрессирование хронических заболеваний почек, нарушается баланс между клеточной пролиферацией и гибелью клеток [5].

В основе потери клеточной массы лежит процесс апоптоза — программируемой гибели клеток (ПГК). При развитии нефросклероза происходит чрезмерная активация апоптоза гломерулярных и тубулярных эпителиоцитов с потерей в первую очередь таких функционально значимых клеток, как подоциты и тубулярные эпителиоциты. Существует 2 взаимосвязанных и взаимодополняющих пути реализации ПГК. Первый — рецепторный, через активацию системы трансмембранных рецепторов Fas (CD95, APO-1), ФНО-Р1 (рецептор фактора некроза опухоли-1 — tumor necrosis factor receptor-1) и соответствующих им лигандов (Fas-лиганд и ФНО α -лиганд) с передачей сигнала через цитоплазмальный белок FADD (Fas-associated death domain) с последующей активацией каскада каспаз (цистеиновых аспартатзависимых протеиназ), что в конечном итоге приводит к гибели клетки. Второй путь запуска апоптоза — внутриклеточный, с активацией митохондрий со снижением мембранного потенциала на внутренней мембране органеллы и набуханием ее матрикса [6].

К индукторам апоптоза относят трансформирующий фактор роста (ТФР) β , ФНО α , сосудистый эндотелиальный ростовой фактор, оксид азота. Суть молекулярных механизмов апоптоза отражают такие лабораторные показатели сыворотки крови, как растворимая фор-

ма Fas-рецептора (sFas) и его лиганда (sFas-L), а также цитохром С, которые являются ключевыми участниками каскада процессов апоптоза [7–9].

В последние годы при изучении процессов ПГК пристальное внимание стали уделять изучению биологической активности белка аннексина V, относящегося к семейству аннексинов. Это связано с тем, что аннексин V, как и другие члены семейства, не выделяется из нормальных клеток — его источником являются только апоптотические клетки [10].

Таким образом, оценка регуляции и степени выраженности процессов апоптоза при ХБП дает возможность глубокого анализа молекулярных механизмов нефросклероза.

Цель исследования: изучить динамику содержания ключевых сывороточных маркеров апоптоза (sFas-рецептора и его лиганда sFas-L, цитохрома С и аннексина V) у детей на разных стадиях ХБП для определения роли апоптоза клеток почечных структур в прогрессировании патологии почек.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

В исследование было включено 68 детей с ХБП, из них 33 девочки и 34 мальчика в возрасте от 3 до 17 лет (средний возраст 8,4 года). Референтную группу составил 21 условно здоровый ребенок.

Все пациенты были распределены по группам в соответствии со стадиями ХБП в зависимости от показателей СКФ, рассчитанных по формуле Шварца (табл. 1):

- 1-я группа — ХБП 1-й ст. — СКФ > 90 мл/мин ($n = 38$);
- 2-я группа — ХБП 2-й ст. — СКФ 89–60 мл/мин ($n = 17$);
- 3-я группа — ХБП 3–4-й ст. — СКФ < 60 мл/мин ($n = 13$).

Методы исследования

У всех участников исследования в сыворотке крови иммуноферментным методом определяли концентрацию растворимых форм sFas-R и sFas-L, а также цитохрома С и аннексина V.

Статистическая обработка данных

Результаты исследования были статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS-21. Данные представлены в виде среднего (S) \pm стандартное отклонение (SD). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Значимое превышение нормальных значений sFas-R, sFas-L, аннексина V обнаружено у детей на всех стадиях ХБП (табл. 2). Уровень цитохрома С существенно превышал физиологический только у детей с ХБП 1-й ст., однако имел тенденцию к повышению и на 2-й и 3-й ст. ХБП.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на всех стадиях ХБП избыточно активирован как Fas-опосредованный, так и митохондриальный путь реализации ПГК.

При проведении дисперсионного анализа установлена сильная корреляция ($R_2 = 0,793$) между выраженностью протеинурии и совокупностью всех 4 показателей.

Таблица 1. Спектр клинических и морфологических диагнозов пациентов на разных стадиях хронической болезни почек

Клинический диагноз	1-я группа СКФ > 90 мл/мин n = 38	2-я группа СКФ 89–60 мл/мин n = 17	3 группа СКФ < 60 мл/мин n = 13
Идиопатический нефротический синдром:	26	8	3
а) активная стадия;	15	8	3
б) стадия частичной/полной ремиссии;	11	-	-
в) морфологический диагноз:			
• болезнь минимальных изменений;	10	-	-
• фокально-сегментарный гломерулосклероз;	10	6	1
• мембранопротрофиеративный гломерулонефрит;	3	2	2
• мезангиопротрофиеративный гломерулонефрит	3	-	-
Неиммунные нефропатии:	12	9	10
а) рефлюкс-нефропатия;	3	3	3
б) наследственный нефрит;	4	3	2
в) тубулопатии;	2	-	-
г) поликистоз почек, аутосомно-доминантный вариант;	1	2	2
д) состояние после перенесенного гемолитико-уремического синдрома	2	1	3

Примечание. СКФ — скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 2. Значение исследуемых маркеров апоптоза у детей в зависимости от стадии хронической болезни почек

Группы	sFas-R (нг/мл)	sFAS-L (нг/мл)	Цитохром С (нг/мл)	Аннексин V (нг/мл)
1-я группа СКФ > 90 мл/мин (n = 38)	0,54 ± 0,16*	0,130 ± 0,01**	1,7 ± 0,72**	1,65 ± 0,18*
2-я группа СКФ 89–60 мл/мин (n = 17)	0,53 ± 0,1*	0,123 ± 0,01	0,38 ± 0,28	1,47 ± 0,14*
3-я группа СКФ < 60 мл/мин (n = 13)	0,50 ± 0,05*	0,122 ± 0,01	0,49 ± 0,7	1,34 ± 1,3*
Группа контроля (n = 21)	1,89 ± 0,37	< 0,01	0,28 ± 0,03	0,225 ± 0,01

Примечание. * — $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля, ** — $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; СКФ — скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 3. Значения маркеров апоптоза у детей с хронической болезнью почек 1-й ст. в зависимости от нозологии

Маркер	Нефротический синдром, активная стадия Протеинурия > 2,5 г/сут	Нефротический синдром, стадия частичной ремиссии Протеинурия < 0,5 г/сут	Нефротический синдром, стадия полной ремиссии Протеинурия отсутствует	Протеинурия при неиммунной патологии (0,7–1 г/сут)	Норма
sFas-R, нг/мл	4,36 ± 0,6***	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,9	4,24 ± 0,7***	1,89 ± 0,37
sFAS-L, нг/мл	0,134 ± 0,03**	0,128 ± 0,04	0,131 ± 0,04	0,139 ± 0,05**	< 0,01
Цитохром С, нг/мл	0,38 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,28 ± 0,03
Аннексин V, нг/мл	1,17 ± 0,08	1,28 ± 0,07	1,25 ± 0,15	1,19 ± 0,2	0,225 ± 0,01

Примечание. ** — $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля, *** — $p < 0,05$ по сравнению с группой пациентов в стадии частичной/полной ремиссии нефротического синдрома.

Связь маркеров активности апоптоза и одного из основных факторов прогрессирования ХБП также свидетельствует о вовлеченности обоих механизмов ПГК в патогенез нефросклероза.

Процессы ПГК играют существенную роль не только в патогенезе склеротических изменений, но и участвуют в формировании различных форм патологии почек. Нарушению механизмов апоптоза отводят значимую

роль и при различных нефропатиях, таких как гломерулонефриты, поликистоз почек, диабетическая нефропатия [11, 12].

В нашем исследовании также был проведен сравнительный анализ значений изучаемых маркеров у пациентов с идиопатическим нефротическим синдромом и группы детей с неиммунной патологией (наследственный нефрит, поликистоз почек, рефлюкс-нефропатия)

в функционально компенсированной стадии болезни (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов показал, что у детей с различной хронической патологией почек без снижения СКФ уровень маркеров апоптоза значительно отличается от нормальных значений. У пациентов как с активной стадией нефротического синдрома, так и с неиммуногенными нефропатиями, сопровождающимися умеренной протеинурией, число sFas-рецепторов было достоверно выше, чем у детей с минимальной протеинурией или при ее отсутствии (частичная/полная ремиссия нефротического синдрома).

Полученные данные позволяют предположить, что при протеининдуцированном апоптозе ведущим является именно Fas-опосредованный его путь.

В нашем исследовании была проведена также сравнительная оценка сыровоточных уровней маркеров апоптоза в условиях терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента и в отсутствии такого лечения. Так, при концентрации исследуемых маркеров у детей с неиммунными нефропатиями в функционально компенсированной стадии болезни было получено статистически значимое превышение ($p < 0,05$) значений растворимой формы Fas-рецептора у детей без терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента по сравнению с детьми, получавшими их в дозе 0,3–0,5 мг/кг в сут ($0,65 \pm 0,2$ и $0,42 \pm 0,1$ нг/мл, соответственно). При анализе возможной разницы показателей ПГК при наличии или отсутствии нефропротективной терапии у детей с ХБП 2-й ст. было установлено, что уровень sFas-R был достоверно выше у детей без лечения ингибиторами ангиотензинпревращающего

фермента ($0,62 \pm 0,06$ и $0,48 \pm 0,07$ нг/мл, соответственно). Концентрация аннексина V у детей с СКФ 60–90 мл/мин оказалась достоверно ниже при приеме ингибиторов АПФ, чем при отсутствии данного лечения ($1,12 \pm 0,01$ и $1,16 \pm 0,02$ нг/мл, соответственно). Следовательно, процессы Fas-опосредованного апоптоза были более выраженными у пациентов без нефропротективной терапии.

Данное положение обосновывает целесообразность проведения уже на 1-й ст. ХБП нефропротективной и антисклеротической терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента, которые выступают в качестве блокаторов одного из ключевых индукторов данного процесса — ТФР β [13]. Необходимо отметить, что и при снижении СКФ проведение нефропротективной терапии уменьшает степень выраженности процессов ПГК как одного из механизмов нефросклероза и тем самым замедляет темпы дальнейшего прогрессирования нефропатий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в развитие и прогрессирование ХБП вовлечены как Fas-опосредованный, так и митохондриальный путь ПГК. Применение с нефропротективной целью ингибиторов АПФ уменьшает выраженность апоптоза, в первую очередь ингибируя активность его Fas-опосредованного механизма реализации.

В соответствии с современными представлениями молекулярной биологии о процессах межклеточных взаимодействий, лежащих в основе нефросклероза, полученные результаты дают основания для продолжения тщательного изучения данных молекулярных процессов с целью совершенствования нефропротективной антисклеротической лечебной стратегии у детей с ХБП [14].

REFERENCES

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* 2002; 39 (2 Suppl. 1): 1–266.
2. Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Kayukov I.G. et al. Khronicheskaya Bolezn' Pochek: Dal'neyshee Razvitie Kontseptsii i Klassifikatsii [Chronic Kidney Disease: Further Development of the Concept and Classification]. *Nefrologiya [Nephrology]*. 2007; 11 (4): 7–17.
3. Fogo A.B. Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2007; 2: 2011–2022.
4. Bohle A., Muller G.A., Wehrmann M. et al. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Am. J. Kidney Dis.* 1996; 49 (Suppl.): 2–9.
5. Komarova O.V., Kucherenko A.G., Smirnov I.E., Tsygin A.N. Rol' Narusheniy Protsessov Apoptoza v Progressirovanii Khronicheskoy Bolezni Pochek u Detey [Role of Apoptosis Disorders in the Progression of Chronic Kidney Disease in Children]. *Nefrologiya i dializ [Nephrology and Dialysis]*. 2013; 15: 135–139.
6. Shirokova A.V. Apoptoz. Signal'nye Puti i Izmenenie Ionogo i Vodnogo Balansa Kletki [Apoptosis. Signaling Pathways and Changes in Ion and Water Balance of the Cell]. *Tsitologiya [Cytology]*. 2007; 49 (5): 385–394.
7. Jaber B.L., Perianayagam M.C., Balakrishnan V.S., King A.J. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. *J. Leuk. Biol.* 2001; 69 (6): 1006–1012.
8. Green D.R., Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004; 305 (5684): 626–629.
9. Dounousi E., Kolioussi E., Papagianni A. Mononuclear leukocyte apoptosis and inflammatory markers in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* 2012; 36: 531–536.
10. Hughes J., Savill J.S. Apoptosis in glomerulonephritis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2005; 14 (4): 389–395.
11. Tao Y., Kim J., Stanley M. et al. Pathways of caspase-mediated apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2005; 67: 909–919.
12. Moiseev S.V., Arutyunov G.P., Fomin V.V. Ingibitory APF i Nefroproteksiya pri Khronicheskikh Zabolevaniyakh Pochek s Proteinuriy [ACE Inhibitors and Nephroprotection at Chronic Kidney Disease with Proteinuria]. *Klinicheskaya Nefrologiya [Clinical Nephrology]*. 2009; 2: 31–36.
13. Bakris G.L. Slowing nephropathy progression: focus on proteinuria reduction. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 3: 3–10.
14. Metcalfe W. How does early chronic kidney disease progress. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007; 22 (Suppl. 9): 26–30.