

МАРКЕРЫ АПОПТОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ

Н.Н.Тарадий¹, И.В.Багдасарова², Я.П.Мандзюк¹, Р.В.Багдасарова¹, В.С.Терещенко³, Я.М.Распопа³.

¹Международный центр астрономических и медико-экологических исследований НАНУ, Государственное учреждение

²«Институт нефрологии АМНУ»,

³Детская клиническая больница №7, Киев.

Цель: исследование состояния маркеров апоптоза в циркулирующих иммунокомпетентных клетках у детей с хроническим пиелонефритом.

Пациенты и методы. Исследовали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в циркулирующих иммунокомпетентных клетках (ИКК), субпопуляциях Т-лимфоцитов CD4 и CD8 экспрессию интрацеллюлярных рецепторов к INFγ и TNFα, индуцибельную оксидазотсинтазу (iNOs), Fas/Apo, проапоптотный белок Вах — и антиапоптотный белок Bcl-2, аннексина V (AnnV) у 23 больных хроническим пиелонефритом и 25 практически здоровых детей.

Результаты. Установлено, что TNFα, Fas/Apo, iNOs и AnnV значительно активизируются в ИКК на фоне высокой экспрессии в них белка Bcl-2. Отмечается высокая экспрессия дифференцировочных маркеров Т-лимфоцитов с преобладанием CD8 над CD4. В лимфоцитах CD4 в пределах контроля экспрессируется INFγ, TNFα, iNOs и AnnV, но снижена экспрессия Fas/Apo, Вах и Bcl-2. В лимфоцитах CD8 установлена значительная активизация экспрессии iNOs, Fas/Apo и AnnV, при нормальном уровне экспрессии TNFα и Bcl-2 и сниженной экспрессии Вах и INFγ. Предполагается, что основную элиминационную функцию выполняют цитотоксические Т-лимфоциты (CD8) при активизации апоптоза по оксид азот (NO)- и Fas-опосредованному пути.

Выводы. При хроническом пиелонефрите у детей роль изучаемых маркеров апоптоза, с одной стороны, определяется участием в компенсаторных реакциях иммунной системы при инфицировании почечной ткани, с другой — объясняет возможность хронизации процесса за счет усиления экспрессии гена Bcl-2 в мононуклеарах циркулирующей крови и уменьшение экспрессии гена Вах в обеих Т-субпопуляциях CD4 и CD8.

Ключевые слова: хронический пиелонефрит, маркеры апоптоза и дифференцировки, иммунокомпетентные клетки.

Введение

Пиелонефрит доминирует в ряде нозологических форм почечных заболеваний и занимает ведущее место в структуре соматической патологии детского возраста. Заболевание протекает с нарушением уродинамики и при неадекватной традиционной терапии, как правило, сопровождается частым рецидивированием микробно-воспалительного процесса в почках. В связи с этим механические воздействия, охлаждения, интоксикация, бактериальные и вирусные инфекции при слабо выраженной регенерации создают высокую степень уязвимости почечных структур. В защите почки от инфекции важнейшая роль принадлежит Т-лимфоцитам (CD4 и CD8), макрофагам и натуральным киллерам (NK/CD16). Т-лимфоциты CD8 (цитотоксические — CTL или Т-супрессоры) и NK способны связывать антиген на поверхности клеток-мишеней и уничтожать инфицированную клетку при участии перфорина, грамзина и сериновых протеаз [5,10,12,27,32,34]. Для поддержания гомеостаза, направленного на элиминацию инфицированных и отживших свой срок клеток, иммунокомпетентные клетки (ИКК) способны экспрессировать в зависимости от вида инфекционного антигена (бактериального или вирусного, внутри- или внеклеточного) мембранные и интрацеллюлярные маркеры и цитокины [3,9,10]. Наилучшим способом удаления из организма инфицированных, отживших и разрушенных клеток является апоптоз (запрограммированная гибель клеток/ЗГК), поскольку ферменты деградации нуклеиновых кислот и белков, активизирующиеся при этом процессе, разрушают ДНК и белок, как самой клетки, так и антигена [4,12,42]. Процесс элиминации возбудителя при этом может быть связан напрямую с аутокринным разрушением пораженной клетки. В настоящее время известны соединения, способствующие выживанию (Bcl-2, Bcl-xl, Bag-1, Bik) и предрасполагающие к гибели клетки (Вах, Вак, Bad, Bid). Поддержание процессов клеточного выживания и пролиферации связано с антиапо-

птозным геном bcl-2, который кодирует синтез мембраноассоциированного белка Bcl2, расположенного на митохондриальной и перинуклеарной мембранах [7,18,22,26,32]. Белки Вах и Вад, продукты соответствующих проапоптотных генов, способны формировать гетеродимеры с Bcl-2 и Bcl-xL вследствие их высокой аминокислотной гомологии. Связывание этих белков в гетеродимеры отменяет антиапоптотические свойства Bcl-2 и Bcl-xL [14,23,25]. Поэтому развитие или предотвращение гибели клетки определяет баланс про- и антиапоптотических молекул [5,47]. Некоторые исследователи отводят процессу апоптоза при воспалении в органах мочевой системы негативное значение, основывая свои заключения на результатах антибактериальной терапии, при которой даже малые дозы препаратов обладают выраженным проапоптотным действием, осложняя процесс репарации почечной ткани [8,11]. Хорошо известно, что апоптоз протекает без лейкоцитарной инфильтрации и перифокального воспаления. Хронизация патологического процесса в почках, в ряде случаев, приводит к развитию почечной недостаточности, особенно при обструктивном пиелонефрите. При этом признаки деструкции почечной ткани обнаруживаются не только непосредственно в очаге инфекционного воспаления, но и в прилегающих зонах. На активизацию гибели клеток кортикального слоя почки при пиелонефрите указывают результаты морфологических исследований [17,30]. Отмечается активизация гибели клеток кортикального слоя почки на фоне замедления роста органа [5,13,16,24]. Анализируя научные данные о роли апоптоза при пиелонефрите, следует отметить, что они касаются в основном патоморфологических деструктивных изменений ткани почки и не касаются характеристики апоптоза циркулирующих ИКК. При некрозе происходит выход в окружающую ткань неповрежденных вирусных частиц и нуклеиновых кислот, способных заражать другие клетки [9,32,35]. Регуляторное влияние на апоптоз оказывают цитокины, циркулирующие в крови или связанные с мем-

браной [3,18]. К биохимическим изменениям при апоптозе относятся процессы, которые затрагивают мембранные фосфолипиды, в частности выделение фосфатидилсерина (PS). При нормальных условиях PS локализуется с цитоплазматической стороны клеточной мембраны, а при апоптозе располагается на наружной поверхности. Передислокация PS на поверхность мембраны клетки наблюдается, начиная с ранней стадии апоптоза, до полной деградации клетки. Аннексин V с высокой степенью аффинности связывается с экспонированным на поверхности апоптотических клеток PS и ингибирует прокоагулянтную и провоспалительную активность гибнущих клеток, покрывает PS по типу ковра и оказывает местный антикоагулянтный эффект. Аннексин V известен как плацентарный, сосудистый антикоагулянтный протеин принадлежит к семейству кальций-зависимых белков, связывающих фосфолипиды [28]. Он представлен во многих тканях, главным образом на эндотелиальных клетках и плаценте. В низких концентрациях аннексин V присутствует в тромбоцитах, в более высоких — в эритроцитах и лейкоцитах. Выраженные антикоагулянтные свойства обусловлены его высоким сродством к анионным фосфолипидам и способностью препятствовать активированным факторам свертывания крови связываться с фосфолипидами клеточных мембран. Сродство аннексина V к PS в 1000 раз выше, чем протромбина [4,28,43].

T-лимфоциты, находящиеся в состоянии покоя, характеризуются низкой экспрессией молекул Fas/Apo и рецепторов к TNF α и относительно высоким уровнем экспрессии антиапоптозного белка Bcl-2, что характеризует неактивные лимфоциты как достаточно резистентные к ЗГК. При активации ИКК чувствительность к апоптозу возрастает в десятки раз, в цитоплазме T-лимфоцитов резко снижается экспрессия белка Bcl-2, а на мембране появляются значительное количество молекул Fas/Apo и TNF α [12,29]. У активированной клетки наряду с приобретенной способностью усиленно делиться проявляется чувствительность к регуляторным влияниям, ограничивающим ее пролиферацию [32,36]. Провоспалительные цитокины и iNOS, вырабатываемые макрофагами, могут приводить к атрофии канальцев и потере функционирующей массы почечной паренхимы при ПН [14,15]. С другой стороны, существует мнение об антиапоптозном эффекте оксида азота, согласно которого оксид азота стабилизирует каспазы, препятствуя их активации, и блокирует Fas-индуцированный путь развития клеточной гибели [20,24,27,38]. Установленные факты

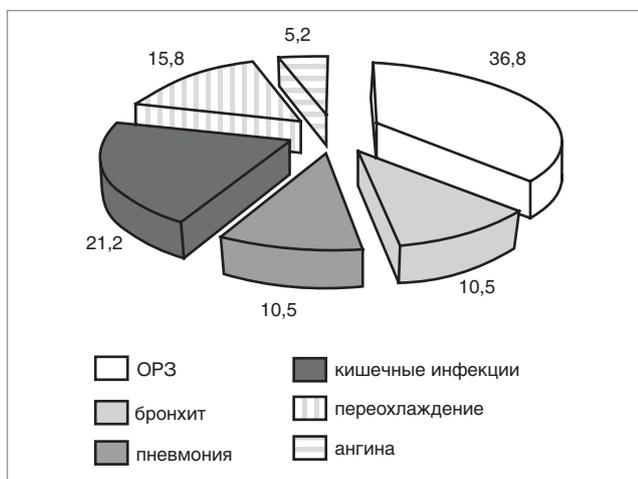


Рис. 1. Диаграмма заболеваний, предшествующих развитию ХПН у детей, %

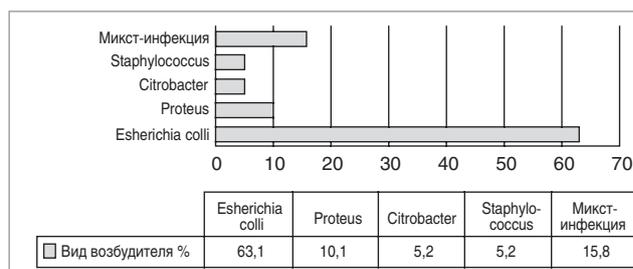


Рис. 2. Идентификация микрофлоры мочи при ХПН у детей

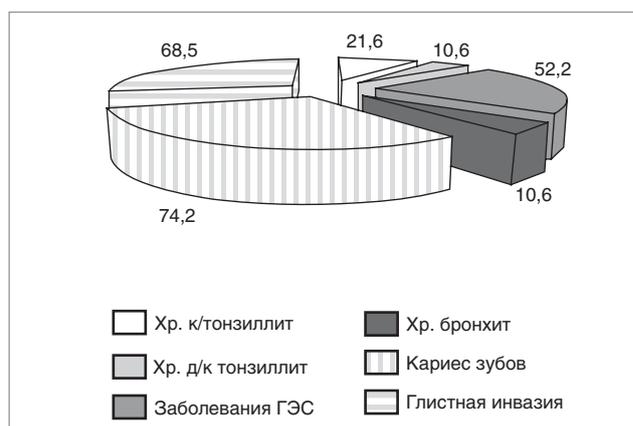


Рис. 3. Сопутствующие заболевания у обследованных детей с ХПН, %

взаимосвязи микробно-воспалительного процесса и нарушения уродинамики с интенсивностью апоптоза в почечной паренхиме [8,13,30,43] не поясняют, тем не менее, хронизацию патогенетического процесса. В связи с этим огромный фундаментальный интерес вызывает исследование при хроническом пиелонефрите у детей состояние маркеров апоптоза в циркулирующих иммунокомпетентных клетках.

Материал и методы исследования

Предметом исследования явились 23 детей, у которых были исключены воспалительные заболевания наружных половых органов и отсутствовали рентгеноструктурные изменения почек при визуальной оценке экскреторных урограмм. Среди обследованных пациентов с ХПН по возрасту доминировали дети до 6-ти лет (63,1%), по полу — девочки (84,2%). Соотношение девочек к мальчикам составляло 5,3:1. Длительность заболевания до 6 месяцев отмечалась у 15,8%, от 6 мес. до 1 года — у 26,3%, от 1 года до 3-х лет — у 36,8%, более 3-х лет — у 21,1%. Развитию ХПН у обследованных пациентов предшествовали (рис. 1): ОРЗ (36,8%), переохлаждения (15,8%), кишечные инфекции (21,2%), пневмония (10,5%), ангина (10,5%).

Лабораторно-клинические исследования показали, что микрофлора мочи была представлена различными микроорганизмами, среди которых доминировала кишечная палочка (63,2%), реже выделялись протей (10,1%) и микст-инфекция (15,8%). Бактериурия определялась в 78,9% случаев, из них истинная — в 52,6% наблюдений (рис. 2). Среди обследованных нами детей с ХПН сопутствующие заболевания документировались в 68,9% случаев. В структуре сопутствующей патологии (рис. 3) преобладали кариез зубов (74,2%), глистная инвазия (68,5%), заболевания гастродуоденальной системы (52,2%). Контрольную группу составили 25 практически здоровых детей в возрасте от 7 до 14 лет, которые были обследованы в соответствии с международным этическим протоколом.

Лимфоциты для определения маркеров дифференцировки и апоптоза выделяли из стабилизированной ЭДТА (50 ммоль/10мл) венозной крови разведенной 1:2 средой RPMI 1640 (Sigma, США) с добавлением 10% инактивированной фетальной телячьей сыворотки (GidcoBRL, Англия) в градиенте плотности фиколл – верографина («Pharmacia», плотность 1,077), трехкратно отмывали раствором PBS (pH7,2; «Flow Labs»). Жизнеспособность клеток составляла 95–98. Фиксацию препаратов проводили на предметных стеклах в маркированных лунках (1x10⁶ клеток в 1 мл) в течение 3 минут в парах 10% нейтрального формалина. Образцы хранились при -40 С° до последующего окрашивания. Перед окрашиванием мазки дважды промывали в PBS. Мембранные дифференцировочные маркеры определяли методом прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD4, CD8, CD16 антигенам, меченных FITC или Cy5 (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва, ОНЦ РАМН). На фиксированные клетки наносили по 20 мкл моноклональных антител в оптимальной концентрации (≤0,5 мкг), инкубировали 30 мин при 4°С в темноте, дважды промывали PBS. На первом этапе проводили окрашивание поверхностных антигенов, на втором этапе интрацеллюлярных маркеров апоптоза. Исследовали экспрессию и колокализацию маркеров апоптоза в ИКК и субпопуляциях Т-лимфоцитов CD4 и CD8. Следует отметить, что под ИКК в проведенных исследованиях подразумевается совокупность мононуклеаров, выделенных при указанных условиях (Т- и В-лимфоциты, NK, моноциты). Маркеры апоптоза Fas/Apo, Bax, Bcl2, iNOs, IFN γ , TNF α выявляли с помощью моноклональных антител. Фиксированные препараты предварительно пермеабилizировали в 10 мкл раствора Cytotfix/Cytoperm (BD™PhosFlow) в течение 10–20 мин при 4 С, дважды промывали в растворе Perm/Wash (BD™PhosFlow). Далее клетки окрашивали 30 мин при 4 С моноклональными АТ, конъюгированными с флуоресцентными метками (FITC, PE, Bcl2, PerCP, Cy5) разного спектра свечения, дважды промывали PBS. Методики приготовления и окрашивания препаратов проводили в соответствии с протоколами BD Transduction Laboratories, Pharmingen™, США. Моноклональные АТ для выявления белка Bcl2 конъюгированы с фикоэритрином (PE) и светятся в желтой части спектра. Белок Bax определяли косвенным иммунофлуоресцентным методом с применением очищенных мышинных моноклональных антител против человеческого Bax в конечной концентрации 5 мкг/мл на 10⁶ ИКК. Связавшиеся первичные антитела визуализировали с помощью вторичных АТ, меченных PerCP. Вторичные АТ – кроличьи антимышинные IgG1, конъюгированные с PerCP – светятся в красной части спектра. iNOs определяли с помощью моноклональных антител, конъюгированных с FITC. Для выявления маркера Fas/Apo (CD95) использовали три вида моноклональных АТ: конъюгированных с FITC, либо с Cy5 (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва, ОНЦ РАМН) или с PE (Pharmingen, США). Ядра клеток окрашивали Hoechst в синий цвет (Sigma, США). Апоптотные клетки определяли с помощью аннексина V и пропидиум йодида (PI). Окрашивание проводили с помощью набора Pharmingen (США). Количество клеток, экспрессирующих определенный маркер, переводили в абсолютные значения в соответствии с системой СИ – гига/л (Г/л) = 10⁹/л. Колокализацию, дислокацию и подсчет маркеров исследовали на двух конфокальных лазерных сканирующих микроскопах Axioskop-2 LSM 5 PASCAL и AxioCam HRO LSM PASCAL 510 META (Carl ZEISS). Объектив – 100/1,4 160/017, окуляр 10 (23), масляная иммерсия. Полученные изображения

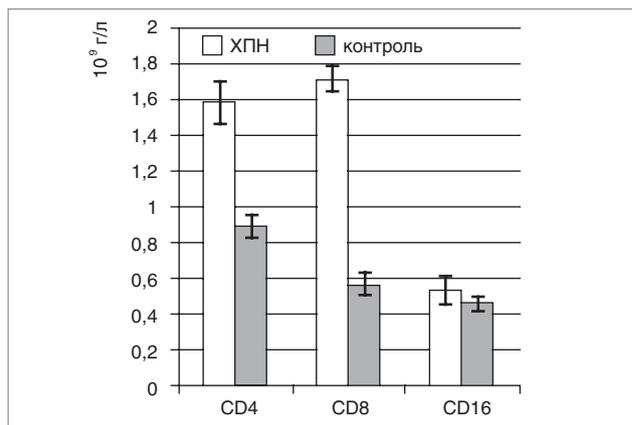


Рис.4. Экспрессия маркеров CD4, CD8, CD16 при хроническом ПН у детей
 Экспрессия маркера натуральных киллеров (NK) CD16 соответствует контрольному уровню (0,53±0,08x10⁹/л).

сканировали и обрабатывались с помощью компьютерной программы LSV510. Статистическую обработку результатов проводили методами описательной статистики и корреляционного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование маркеров дифференцировки у детей при ХПН показало, что в выделенных лимфоцитах экспрессия CD4 и CD8 значительно повышена (1,59±0,11x10⁹/л и 1,72±0,07x10⁹/л, соответственно, p<0,001). Соотношение CD4(Th) к CD8(CTL) снижено до 0,97±0,07 по сравнению с контрольной группой (1,56±0,09, p<0,001) за счет более высокой экспрессии CD8 (рис. 4).

Иммунокомпетентные клетки у детей при хроническом ПН значительно усиливают экспрессию внутриклеточного рецептора к TNF α , iNOs, Bcl-2, Fas/Apo и AnnV (на рис.5 – ICC). Наиболее высокая экспрессия характерна для iNOs, уровень которой в 2,2 раза выше контроля. При этом в пределах нормы в ИКК циркулирующей крови сохраняется экспрессия проапоптотного белка Bax и внутриклеточного рецептора к INF γ . На рис. 6 (а) представлен типичный результат дислокации Bax и INF γ в ИКК здорового ребенка. При двойном окрашивании ИКК антителами против Bax(PrCP) и INF γ (FITC) отмечается распределение красно-малинового свечения Bax по периферии клетки с колокализованными рядом зелеными конгломератами INF γ . Преимущественно INF γ экспрессируется раздельно в цитозоле в виде точечных конгломератов \varnothing 0,2–0,3 μ m.

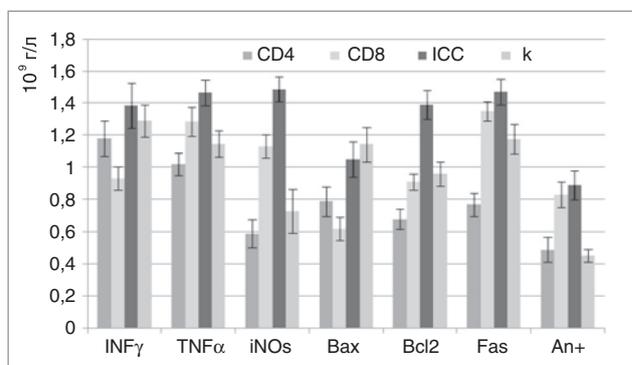


Рис. 5. Экспрессия маркеров апоптоза при хроническом ПН у детей. ICC — циркулирующие ИКК больных ХПН детей, k — циркулирующие ИКК условно здоровых детей.
 По вертикальной оси — абсолютное количество клеток x 10⁹/л

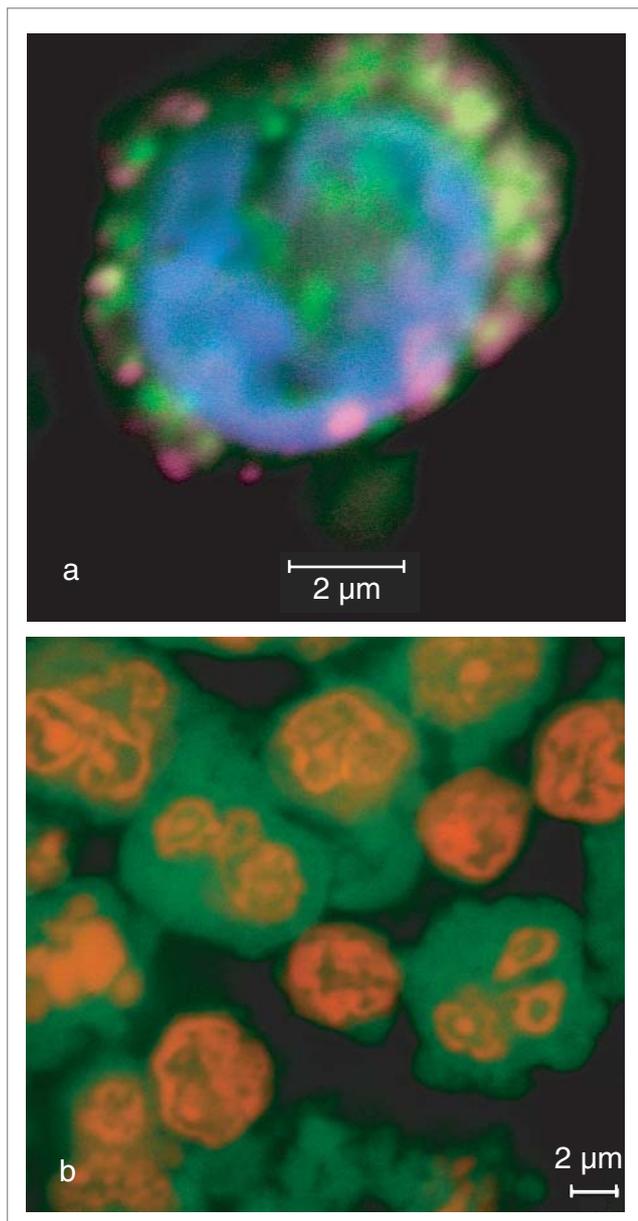


Рис.6 (а) — Экспрессия белка Вах (малиновое свечение PrCP) и рецепторов к $\text{INF}\gamma$ (зеленое свечение FITC) в ИКК здорового ребенка. КЛСМ. Ядро окрашено в синий цвет Hoechst, маркер — $2\ \mu\text{m}$, ув.х 3900; (б) Зеленое свечение iNOs (FITC) в ИКК больного ХПН. Ядра окрашены в красный цвет PI. По результатам КЛСМ, маркер — $2\ \mu\text{m}$ ув. х 3000, масл. имм.

На рис. 6 (б) представлен типичный результат дислокации iNOs, меченной FITC (окрашивает цитоплазму клеток в зеленый цвет) в ИКК больного ХПН. Часть клеток с высокой экспрессией iNOs имеют фрагментированные ядра либо ядерный хроматин в деконденсированном состоянии. Распределение изучаемых маркеров в субпопуляциях CD4 и CD8 отличалось от суммарной экспрессии в ИКК и друг от друга. В CD4-клетках уровень экспрессии $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, iNOs и AnnV соответствовал контролю, тогда как экспрессия Вах, Bcl-2 и Fas была значительно снижена. В лимфоцитах CD8 определяется соответствующий контролю уровень $\text{TNF}\alpha$ и Bcl-2, снижение экспрессии $\text{INF}\gamma$ и Вах на фоне высокой экспрессии iNOs, Fas и AnnV. При сравнении присутствия маркеров апоптоза в субпопуляциях Т-лимфоцитов отмечается превалирование активизации

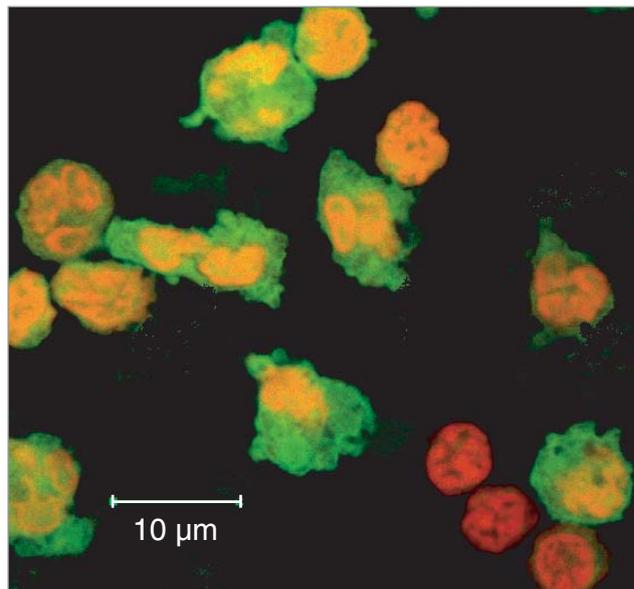


Рис.7 Апоптоз ИКК циркулирующей крови у больного хроническим ПН. Апоптотные клетки с фрагментированными оранжево-красными ядрами (PI), в цитоплазме — зеленое свечение AnnV, меченного FITC. КЛСМ, маркер $10\ \mu\text{m}$, ув. х2000, мас.имм.

ции экспрессии в CD8-клетках $\text{TNF}\alpha$, iNOs, Bcl-2, Fas и AnnV. В наибольшей степени различия затрагивают iNOs ($>$ в 1,92 раза), Fas-маркер ($>$ в 1,75 раза) и AnnV ($>$ в 1,69 раза). Вместе с тем в CD8-лимфоцитах экспрессия $\text{INF}\gamma$ и белка Вах ниже, чем в CD4. Лимфоциты CD8 одновременно с высоким уровнем экспрессии AnnV содержат большее число клеток с фрагментированными ядрами, чем CD4. На рис. 7 представлен препарат ИКК больного хроническим ПН, в котором визуализируются лимфоциты в различных стадиях апоптоза с широкой вуалеподобной зеленой цитоплазмой (соответствует свечению AnnV, меченного FITC, и связанного с фосфотидилсерином) и фрагментированными красными ядрами (окраска PI).

Причиной активации экспрессии дифференцировочных маркеров Т-лимфоцитов CD4 и CD8 при хроническом ПН у детей является инициация воспалительного процесса в почках, которая вызвана инфекционными агентами. Это подтверждается нашими микробиологическими исследованиями, в результате которых отмечалась бактериурия с доминированием бактерий кишечной палочки, протей и микст-инфекции у 78,9% детей. Согласно иммунологическим критериям, ведущая роль в защите от внеклеточных и вирусных инфекций принадлежит CD4-лимфоцитам, поскольку только эти клетки способны распознавать антиген-пептидные комплексы с молекулами МНС-II [5,10,12]. В наших исследованиях увеличение числа CD8-лимфоцитов в циркулирующей крови при ХПН у детей характеризуется высокой экспрессией в этих клетках маркеров апоптоза Fas/Apo и iNOs, что опровергает мнение авторов [20,24,27,38] об антиапоптотном эффекте оксида азота, который блокирует Fas-индуцированный путь клеточной гибели. Цитотоксические Т-лимфоциты CD8 имеют высокую экспрессию в них AnnV, за счет которого ингибируется прокоагулянтная и провоспалительная активность гибнущих клеток. Следует отметить, что к снижению апоптоза могут приводить экзогенные факторы, действующие через специализированные рецепторы для Fas/Apo, факторы роста нервов, $\text{TNF}(\alpha, \beta)$, CD27, CD30, CD40 или экзогенные факторы, действующие через рецепторы для глюко-

кортикоидов, цитокинов (TNF α , INF γ), β -токоферола, ИЛ-1, а также подавляться индукцией сигналов, локализующихся внутри самой клетки [4,26].

При ХПН у детей в ИКК повышена экспрессия внутриклеточного TNF α . Известно, что при увеличении числа рецепторов к TNF α возрастает возможность более активного их связывания с лигандом и мобилизацией в клетке белка TRADD (TNF receptor-associated death domain). Экспрессия интрацеллюлярных TNF α -рецепторов, в свою очередь, индуцирует экспрессию дополнительных Fas-рецепторов на Т-лимфоцитах, HLA-DR и рецептора ИЛ-2 [22].

Патогенетическая роль Вах в программе апоптоза объясняется его способностью вызывать разрушение митохондриальной мембраны и направлять процесса ЗКГ по каспазо-зависимому пути [12]. Белок Вах, продукт проапоптозного гена *bax*, не способен сам по себе вызывать апоптоз. Увеличение его экспрессии ускоряет развитие апоптоза после предварительных сигналов смерти, к которым можно отнести активацию цитокинами (INF γ и TNF α) или взаимодействие Fas-R с Fas-L [37]. Экспрессия Вах в ИКК у больных ХПН детей соответствовала контролю, а в CD4- и CD8-лимфоцитах была снижена, поэтому можно предположить, что каспадозависимый путь активации апоптоза в этом случае уступает Fas — iNOs-индуцированному (экспрессия рецепторов для INF γ в CD8 и Fas/Apo в CD4 значительно ниже контроля, при $p < 0,0001$). Таким образом, при прочих равных условиях преобладание продукции белка Вах над белком Bcl-2 будет способствовать гибели клетки (если поступил к тому соответствующий сигнал), а при преобладании белка Bcl-2 клетка с большей вероятностью будет защищена от гибели, поскольку Bcl-2 стабилизирует митохондриальные мембраны и препятствует выходу цитохрома С в цитоплазму, предотвращая активацию проапоптотических факторов.

При ХПН у детей экспрессия CD16 соответствует контрольному уровню, что можно расценивать как благоприятный показатель. Маркер CD16 известен как киллерингибирующий рецептор (killer cell inhibitory receptor) нормальных киллеров (NK) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и является единственным из ингибиторных маркеров, работающий с растворимыми лигандами. Через активацию CD16 осуществляется антителозависимая цитотоксичность, запуск ионов кальция в клетку, индуцируется активность фосфолипазы С и продукция ИЛ-2 [12]. На активацию апоптоза по Fas-индуцированному пути при хроническом ПН у детей указывает совокупность полученных при исследовании факторов: активация экспрессии аннексина V, который связывается с фосфотидилсеринем, фрагментация ядер и высокий уровень экспрессии Fas/Apo в общей совокупности выделенных ИКК и CD8-лимфоцитах. Необходимо отметить, что основная функция Fas-регулируемого пути гибели клетки заключается в завершении иммунного ответа посредством стимуляции делеции активированных зрелых Т-лимфоцитов. Высокая степень сохранности ИКК при ХПН у детей, обусловленная активацией экспрессии гена Bcl-2, крайне необходима на этапе острого воспалительного процесса. Если неактивные лимфоциты достаточно резистентны к ЗКГ, то воспалительный процесс неизбежно приводит к антигенной активации, при которой чувствительность ИКК к апоптозу многократно возрастает. В нашем случае при хроническом ПН незавершенный инфекционный процесс приводит к патологичному апоптозу, при котором в выделенных ИКК экспресси-

руется большое количество молекул Fas/Apo, TNF α , iNOs, передислоцируется PS на фоне высокой экспрессии в них белка Bcl2. Результаты исследования маркеров апоптоза Т-субпопуляций указывают, что CD8-CTL при хроническом ПН у детей в определенной мере следуют классической картине апоптоза при инфекционном процессе: они значительно увеличивают экспрессию Fas/Apo, TNF α , iNOs, AnnV, хотя не снижают, но сохраняют нормальный уровень экспрессии антиапоптозного белка Bcl2. Продукция проапоптозного гена Вах снижена в CD8 больше, чем в CD4-лимфоцитах. CD4 Th в данном случае не активируют экспрессию TNF α , INF γ , iNOs и AnnV. Все эти маркеры экспрессируются в CD4-лимфоцитах в пределах здоровой группы, что может быть недостаточно для активизации компенсаторной активности иммунной системы больного ребенка. Слабая экспрессия Fas/Apo в CD4 не способна, вероятно, активизировать экспрессию гена Вах. При этом уровень экспрессии белка Bcl2 в CD4 статистически равнозначен уровню экспрессии в них белка Вах. Сниженная ниже контроля экспрессия Вах в CD4 указывает на блокирование в них Fas-опосредованной активации апоптоза.

Выводы

Таким образом, при хроническом пиелонефрите у детей роль изучаемых маркеров апоптоза, с одной стороны, определяется участием в компенсаторных реакциях иммунной системы при инфицировании почечной ткани, с другой — объясняет возможность хронизации процесса за счет усиления экспрессии гена Bcl-2 в мононуклеарах циркулирующей крови и уменьшение экспрессии гена Вах в обеих Т-субпопуляциях CD4 и CD8. Активация экспрессии проапоптозного рецептора к TNF α приводит к индукции экспрессии дополнительных Fas-рецепторов. Высокая экспрессия Fas/Apo в ИКК у больных хроническим ПН детей с одновременной активацией экспрессии маркера CD8 и высокой экспрессией iNOs свидетельствуют об активации апоптоза по NO- и Fas-опосредованному пути. Следовательно, основную роль в элиминации инфицированных клеток у больных ХПН детей выполняют цитотоксические Т-лимфоциты. Активизация экспрессии iNOs приводит к паракринному и аутокринному высвобождению оксида азота, который индуцирует выделение токсических для патогенов субстанций, способствуя усилению апоптотической гибели внутриклеточно персистировавших антигенов. Субпопуляция CD4 Т-лимфоцитов на фоне клинических признаков болезни сохраняет способность к апоптозу в пределах нормы. Другим аргументом в пользу компенсаторных реакций иммунной системы при хроническом ПН у детей может быть уровень экспрессии внутриклеточного INF γ (идентичный контролю), представляющего собой резерв макрофагальной и цитотоксической активности в антивирусной и антипролиферативной защите. Активация экспрессии AnnV у больных ХПН обеспечивает прокоагулянтную и противовоспалительную защиту гибнущих клеток, значительно снижает тем самым тромбообразование в ткани почки. Снижение экспрессии внутриклеточного рецептора к INF γ в CTL и Th является показателем к назначению иммунокорректирующей терапии препаратами интерферона или усиливающими выработку циркулирующих интерферонов в сочетании с антибактериальной этиотропной терапией и может способствовать благоприятному завершению воспалительного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

- Григорьева Т. Ю. Различная чувствительность к индукции апоптоза Т-лимфоцитов субклассов CD4 и CD8 / Т. Ю. Григорьева, М. Ф. Никонова, А. А. Ярилин // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 4. — С. 200—2005.
- Ковальчук Л. В. Роль оксида азота в иммунопатогенезе стафилококковых инфекций / Л. В. Ковальчук, З. Ф. Хараева // Иммунология. — 2003. — Т. 24, № 3. — С. 186—188.
- Потапнев М. П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М. П. Потапнев // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 4. — С. 237—243.
- Программированная клеточная гибель / под ред. Я. С. Новикова. — СПб.: Наука, 1996. — 276 с.
- Паунова С. С. Апоптоз — физиология и патология / С. С. Паунова // Нефрология и диализ. — 2002. — Т. 6, № 2. — С. 132—137.
- Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций / Проскуряков С. Я., Бикетов С. И., Иванников А. И. [и др.] // Иммунология. — 2000. — № 4. — С. 920.
- Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. — М.: Мир, 2000. — 582 с.
- Цаликова Ф. Д. Апоптоз в патогенезе нефропатий / Ф. Д. Цаликова // Нефрология и диализ. — 1999. — № 2. — С. 54—62.
- Экспрессия маркеров иммунокомпетентных клеток, цитокинов и метаболизм L-аргинина при комплексной крайневысококачественной и интерферонотерапии воспалительных заболеваний у женщин, длительно проживающих в условиях высокогорья / Тарадий Н. Н., Багдасарова И. В., Узденова З. Х. [и др.] // Физиологич. журн. — 2003. — Т. 49, № 3. — С. 80—90.
- Труфакин В. А. Проблемы гистофизиологии иммунной системы / В. А. Труфакин, А. В. Шурлыгин // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 1. — С. 48.
- Хаитов Р. М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Иммунология. — 2003. — Т. 24, № 4. — С. 196—202.
- Хаитов Р. М. Иммунология / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. — М.: Медицина, 2000. — 432 с.
- Bonegio R. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure / R. Bonegio, W. Lieberthal // Curr Opin Nephrol Hypertens. — 2002. — Vol. 11, № 3. — P. 301—308.
- An investigation into the role of Bcl2 in neuroendocrine differentiation / Cadden I. S., Johnston B. T., Connolly R. [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — Vol. 326, № 2. — P. 442—448.
- Cbertin B. The role of nitric oxide in reflux nephropathy / B. Cbertin, U. Rolie, P. Puri // Pediatr Surg Int. — 2002. — Vol. 18. — P. 630—634.
- Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic Escherichia coli toxins / Chen M., Tofighi R., Bao W. [et al.] // Pediatr Nephrol. — 2006. — Vol. 21, № 3. — P. 382—389.
- Annexin 5 mediates a peroxide— induced Ca²⁺ influx in B cells / Kubista H., Hawkins T. E., Patel D. R. [et al.] // Current Biology. — 1999. — Vol. 9, № 23. — P. 1403—1408.
- IL1beta sensitizes rat intervertebral disc cells to Fas ligand mediated apoptosis in vitro / Cui L.Y., Liu S.L., Ding Y. [et al.] // Acta Pharmacol. Sin. — 2007. — Vol. 28, № 10. — P. 1671—1676.
- P53mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase3 independent, but caspase9dependent pathway in oridonintreated MCF7 human breast cancer cells / Cui Q., Yu J. H., Wu J. N. [et al.] // Acta Pharmacol. Sin. — 2007. — Vol. 28, № 7. — P. 1057—1066.
- A dual role of IFNalpha in the balance between proliferation and death of human CD4+ T lymphocytes during primary response / Dondi E., Roue G., Yuste V. J. [et al.] // J. Immunol. — 2004. — Vol. 15, № 9, 173(6). — P. 3740—3747.
- Apoptosis via the B cell antigen receptor requires Bax translocation and involves mitochondrial depolarization, cytochrome C release, and caspase9 activation / Eldering E., Mackus W. J., Derks I. A. [et al.] // Eur. J. Immunol. — 2004. — Vol. 34, № 7. — P. 1950—1960.
- Caspase family proteases and apoptosis / Fan T. J., Han L. H., Cong R. S. [et al.] // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). — 2005. — Vol. 37, № 11. — P. 719—727.
- Alterations in mRNA expression of apoptosisrelated genes BCL2, BAX, FAS, caspase3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide / Floros K. V., Thomadaki H., Florou D. [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 109, № 6. — P. 89—97.
- TNFlike weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells / Gao H. X., Campbell S. R., Burkly L. C. [et al.] // Cytokine. — 2009. — Vol. 114, № 2. — P. 113—120.
- Green D. The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria? / D. Green, G. Kroemer // Trends. Cell. Biol. — 1998. — Vol. 8. — P. 267—271.
- Green D. R. Mitochondria and apoptosis / D. R. Green, J. C. Reed // Science. — 1998. — Vol. 281. — P. 1309—1312.
- Greenberg A. H. Activation of apoptosis pathways by granzyme B / A. H. Greenberg // Cell Death Differ. — 1996. — Vol. 3. — P. 269—274.
- In vitro and in silico analysis of annexin V binding to lymphocytes as a biomarker in emergency department sepsis studies / Greineder C. F., Nelson P. W., Dressel A. L. [et al.] // Acad. Emerg. Med. — 2007. — Vol. 14, № 9. — P. 763—771.
- Hou Q. Bax translocates from cytosol to mitochondria in cardiac cells during apoptosis: development of a GFPBaxstable H9c2 cell line for apoptosis analysis / Q. Hou, Y. T. Hsu // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2005. — Vol. 289, № 1. — P. 477—487.
- Hauser P. Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal disease / P. Hauser, R. Oberbauer // Wein Klin. Wochenschr. — 2002. — Vol. 114, № 15—16. — P. 671—677.
- Apoptosis and cell proliferation: the paradox of salivary glands in Sjogren's disease / Herrera-Esparza R., Bollainy-Goytia J., Ruvalcaba C. [et al.] // Acta Reumatol. Port. — 2008. — Vol. 33, № 3. — P. 299—303.
- Immunology: understanding the immune system / Klaus D. Elgert, 1996. P. 468
- Kroliczak W. P53dependent suppression of the human calcyclin gene (S100A6): the role of Sp1 and of NFkappaB / W. Kroliczak, M. Pietrzak, M. Puzianowska-Kuznicka // Acta Biochim Pol. — 2008. — Vol. 55, № 3. — P. 559—570.
- BclXL small interfering RNA sensitizes cisplatinresistant human lung adenocarcinoma cells / Lei X., Huang Z., Zhong M. [et al.] // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). — 2007. — Vol. 39, № 5. — P. 344—350.
- Liaudet L. Biology of nitric oxide signaling / L. Liaudet, F. G. Soriano, C. Szabo // Crit. Care Med. — 2000. — Vol. 28. — P. 37—52.
- Effect of tissue factor pathway inhibitor on apoptosis of rat mesangial cells and Fas and bcl2 expression / Lin Y. F., Ma D., Liang W. [et al.] // Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi. — 2008. — Vol. 37, № 11. — P. 754—759.
- Curcumin induces cell death without oligonucleosomal DNA fragmentation in quiescent and proliferating human CD8+ cells / Magalska A., Brzezinska A., Bielak-Zmijewska A. [et al.] // Acta Biochim. Pol. — 2006. — Vol. 53, № 3. — P. 531—538.
- Fasinduced caspase denitrosylation / Mannick J. B., Hausladen A., Liu L. [et al.] // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 651—665.
- Increased p53 level, Bax/Bcl(L) ratio, and TRAIL receptor expression in human emphysema / Morissette M. C., Vachon-Beaudoin G., Parent J. [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2008. — Vol. 178, № 3. — P. 240—247.
- Determination of nitric oxide synthase activity and apoptosis of germ cells in different obstruction models / Oktem G., Altay B., Turna B. [et al.] // Acta Histochem. — 2009. — Vol. 111, № 2. — P. 119—126.
- The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: necrosis versus apoptosis / Rosal R., Brandt-Rauf P., Pincus M.R. [et al.] // Adv. Drug Deliv. Rev. — 2005. — Vol. 28, № 4. — P. 653—660.
- Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns / Singer A. J., McClain S. A., Taira B. R. [et al.] // Acad. Emerg. Med. — 2008. — Vol. 15, № 6. — P. 549—554.
- Bcl-2 expression and apoptosis in nephrotoxic nephritis / Sugiyama H., Kashiwara N., Onbe T. [et al.] // Exp. Nephrol. — 1997. — Vol. 5, № 6. — P. 481—489.
- Tichy A. Apoptotic machinery: the Bcl2 family proteins in the role of inspectors and superintendents / A. Tichy // Acta Medica (Hradec Kralove). — 2006. — Vol. 49, № 1. — P. 13—18.
- The profile of gene expression and role of nuclear factor kappa B on glomerular injury in rats with Thy1 nephritis / Wang H., Jiang X.M., Xu J. H. [et al.] // Clin. Exp. Immunol. — 2008. — Vol. 152, № 3. — P. 559—567.

46. Glucoseregulated protein 75 suppresses apoptosis induced by glucose deprivation in PC12 cells through inhibition of Bax conformational change / Yang L., Liu X., Hao J. [et al.] // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. — 2008. — Vol. 40, № 4. — P. 339—348.
47. Role of Apoptosis and Bcl-2/Bax in the Development of Tubulointerstitial Fibrosis during Experimental Obstructive Nephropathy / Zhanga G., Oldroyda S., Huangb L. [et al.] // *Exp. Nephrol.* — 2001. — № 9. — P. 71—80.

МАРКЕРИ АПОПТОЗА**ПРИ ХРОНІЧНОМУ ПІЄЛОНЕФРИТІ У ДІТЕЙ**

*Н.Н. Тарадій¹, І.В. Багдасарова², Я.П. Мандзюк¹,
Р.В. Багдасарова¹, В.С. Терещенко³, Я.М. Распопа³*

¹Міжнародний центр астрономічних і медико-екологічних досліджень НАНУ, Україна

²Державна установа «Інститут нефрології НАМНУ», Україна

³Дитяча клінічна лікарня №7, Київ, Україна

Мета: дослідження стану маркерів апоптозу у циркулюючих імункомпетентних клітинах у дітей з хронічним пієлонефритом.

Пацієнти і методи. Досліджували за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії у циркулюючих імункомпетентних клітинах (ІКК), субпопуляціях Т-лімфоцитів CD4 і CD8 експресію інтрацелюлярних рецепторів до ІNFγ і TNFα, індукцибельну окисазотсинтазу (іNOs), Fas/Apo, проапоптотний білок Вах — і антиапоптотний білок Bcl-2, аннексинаV (AnnV) у 23 хворих на хронічний пієлонефрит і 25 практично здорових дітей.

Результати. Встановлено, що TNFα, Fas/Apo, іNOs та AnnV значно активуються в ІКК на тлі високої експресії у них білка Bcl-2. Визначається висока експресія диференційованих маркерів Т-лімфоцитів з переважанням CD8 над CD4. У лімфоцитах CD4 у межах контролю експресується ІNFγ, TNFα, іNOs і AnnV, але знижена експресія Fas/Apo, Вах і Bcl-2. У лімфоцитах CD8 встановлена значна активізація експресії іNOs, Fas/Apo і AnnV, при нормальному рівні експресії TNFα і Bcl-2 та зниженій експресії Вах і ІNFγ. Висловлюється припущення, що основну елімінаційну функцію виконують цитотоксичні Т-лімфоцити (CD8) при активізації апоптозу окисазот (NO) — і Fas-опосередкованим шляхом.

Висновки. При хронічному пієлонефриті у дітей роль маркерів апоптозу, що вивчалися, з одного боку, визначається участю у компенсаторних реакціях імунної системи при інфікуванні ниркової тканини, з іншої — пояснює можливість хронізації процесу за рахунок посилення експресії гена Bcl-2 у мононуклеарах циркулюючої крові та зменшення експресії гена Вах в обох Т-субпопуляціях CD4 і CD8.

Ключові слова: хронічний пієлонефрит, маркери апоптозу і диференціювання, імункомпетентні клітини.

**APOPTOSIS MARKERS DURING
THE CHRONIC PYELONEPHRITIS IN CHILDREN**

*N.N. Taradiy¹, I.V. Bagdasarova², Ya.P. Mandzyuk¹,
R.V. Bagdasarova¹, V.S. Tereschenko³, Ya.M. Raspopa³*

¹International Center of Astronomical, Medical and Ecological Researches of NASU,

²State Institution «Institute of Nephrology NAMSU»

³Children's Hospital № 7, Kiev

Purpose: To study apoptosis marker status in the circulating immune competent cells in children with chronic pyelonephritis.

Patients and methods. In 23 patients with chronic pyelonephritis, and 25 healthy children the expression of intracellular receptors to ІNFγ and TNFα, inducible nitrogen oxide synthase (іNOs), Fas/Apo, proapoptotic protein Bax – and anti-apoptotic protein Bcl-2, annexing V (AnnV) is examined through the use of confocal laser scanning microscopy in the circulating immune competent cells (ICC), subpopulations of T lymphocytes CD4 and CD8.

Results. It is found that TNF, Fas /Apo, іNOs AnnV much more activated in the ICC against the high expression of protein Bcl-2 in their composition. A high expression of differentiation markers of T lymphocytes with a predominance of CD8 CD4 is marked. In CD4 lymphocytes within the control ІNFα, TNFγ, іNOs and AnnV were expressed while Fas/Apo, Bax and Bcl-2 has reduced expression. In the CD8 lymphocytes significant activation of іNOs, Fas / Apo and AnnV expression during the normal level of TNFα and Bcl-2 expression and Bax and ІNFγ decreased expression was established. It is assumed that the main elimination function is performed by cytotoxic T lymphocytes (CD8) during the activating apoptosis by nitrogen oxide (NO) — and Fas-mediated way.

Conclusions. In chronic pyelonephritis in children the role of studied markers of apoptosis on the one hand is defined by participation in the compensatory reactions of the immune system during the kidney tissue infection, on the other hand- explains the possibility of chronic process due to enhancing of expression the Bcl-2 gene expression in the mononuclear of circulating blood and decreased expression of the Bax gene in both T- subpopulations CD4 and CD8.

Key words: chronic pyelonephritis, markers of apoptosis and differentiation, immune cells.



Best social
projects
of Ukraine

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФОРУМ "Лучшие социальные проекты Украины" 17 апреля 2013г.

"УКРАИНСКИЙ ДОМ" (г. Киев, ул. Крещатик, 2, 5-й этаж)

При поддержке:

Министерства здравоохранения Украины,
Министерства социальной политики Украины,
Министерства образования и науки,
молодежи и спорта Украины,
Министерства экологии и природных ресурсов Украины,
КГГА.

Организатор:



Знаете ли вы какие социальные программы и проекты в сфере здравоохранения реализовываются в Украине



Посетите экспозицию социальных проектов,
в рамках форума
"Лучшие социальные проекты Украины"
и узнайте больше.

* Посещение экспозиции социальных проектов бесплатное
при заполнении анкеты посетителя на стойке регистрации.

Контакты Организатора: Компания социального маркетинга "О два",
тел.: +38 (044) 591-28-48, 223-09-32,
e-mail: pr@o2.ua,
www.forum.o2.ua

Генеральный ТВ-партнер:



Официальный медиа-партнер:



Экспертный партнер:



Информационные партнеры:

