

КЛІТИННА ГІПОКСІЯ ЯК МЕХАНІЗМ ПОШКОДЖЕННЯ НИРОК ПРИ ХРОНІЧНОМУ ПІЄЛОНЕФРИТІ У ДІТЕЙ

¹ В.Г. Майданник, ^{1,2} Є.А. Бурлака, ³ І.В. Багдасарова, ³ О.В. Лавренчук

¹ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

² Каролінський інститут, Стокгольм, Швеція

³ ДУ «Інститут нефрології НАМН України», Київ, Україна

Мета: дослідження маркерів хронічної гіпоксії та окисного стресу як критеріїв активності мікробного запалення та його перебігу у дітей з хронічним пієлонефритом.

Пацієнти і методи. В умовах стаціонару обстежено 23 дитини віком від 1 до 17 років з різними формами хронічного пієлонефриту, з них 14 пацієнтів знаходились у стадії клініко-лабораторної ремісії, а 9 — в стадії загострення та отримували антибактеріальну терапію. Обстеження включало: загальний аналіз крові та сечі, аналіз сечі за Нечипоренком, біохімічний аналіз крові, ультразвукове обстеження нирок, добове моніторування артеріального тиску, мікційну цистографію. Стан функції нирок оцінювали шляхом розрахунку швидкості клубочкової фільтрації за формулою Шварца та проведенням реносцинтиграфії.

Результати. Встановлено, що розвиток захворювання супроводжувався ростом швидкості генерування супероксидних радикалів Nox2 нейтрофілів, підвищенням рівня індукованого гіпоксією фактора $\text{HIF-1}\alpha$ та зниженням активності фактора системи антиапоптозного захисту Bcl-xL . Виявлено залежність ступеня порушення рівнів даних показників від стадії захворювання та доведено доцільність їх застосування у якості предикторів несприятливого перебігу пієлонефриту.

Висновки. Визначення маркерів хронічної гіпоксії та окисного стресу допоможе підібрати патогенетично обґрунтовані терапевтичні засоби і тим самим уповільнити прогресування патологічного процесу у нирках, а їх моніторинг у динаміці дозволить оцінити ефективність терапії.

Ключові слова: хронічний пієлонефрит, діти, клітинна гіпоксія, запалення, апоптоз, Bcl-xL .

Вступ

Гіпоксія — це патологічний стан, який асоціюється зі зниженням доступності кисню на клітинному рівні. Зниження біодоступності кисню в клітинах при хронічному захворюванні нирок, що розвивається в результаті тубулоінтерстиціального ураження, було продемонстровано на деяких експериментальних моделях хронічної хвороби нирок [1]. В реалізації пошкоджень тканин нирок, індукованих гіпоксією, беруть участь ряд транскрипційних факторів, у тому числі гіпоксія-індукований фактор-1 (HIF-1). HIF-1 є гетеродимерним білком, що складається з субодиниць α і β . За умов клітинної гіпоксії відбувається переміщення $\text{HIF-1}\alpha$ в ядро. Там він гетеромеризується з $\text{HIF-1}\beta$ і впливає на транскрипцію генів, що беруть участь у регуляції обміну речовин, ангиогенезі, апоптозі, і клітинну відповідь на стресові фактори [2].

Гіпоксія, як супровідний компонент запалення та окисних порушень, є причиною багатьох структурних та функціональних розладів органа-мішені. Хронічна гіпоксія супроводжується стабілізацією та активацією фактора, що індукується гіпоксією (HIF) [8]. HIF є гетеродимером, що складається з O_2 -регульованої α -субодиниці та конститутивної β -субодиниці. $\text{HIF-1}\alpha$ є критично важливим активатором експресії ряду генів у відповідь на вплив гіпоксії. Мішенню його впливу є гени ангиогенних факторів росту, майже всіх гліколітичних ферментів, гемоксигенази. Крім того, його активація відповідає за безпосереднє спрямування життєвого циклу клітини, зокрема запуск апоптозу [7,8].

Патогенез хронічного пієлонефриту, як і іншої хронічної патології нирок, пов'язаний з хронічним запаленням. Запалення, що лежить в основі патогенезу хронічного пієлонефриту, проявляється як у формі ізольованої локальної запальної реакції, так і частиною системного запального розладу, який призводить до інтерстиціального фіброзу, каналцевої атрофії, гломерулярно-тубу-

лярного роз'єднання [5]. Хронічне запалення супроводжується метаболічними і структурними порушеннями на клітинному рівні та в межах клітинного оточення, зокрема хронічної гіпоксії, що призводить до ураження тубуло-інтерстиціального відділу нирок [3].

Взаємозалежні явища, які ініціюють і супроводжують розвиток хронічної хвороби нирок (активація генерування супероксидних радикалів у мітохондріях клітин, формування клітинної гіпоксії, інфільтрація тканин нейтрофілами) — важливі патофізіологічні чинники, що визначають клінічні наслідки у хворих [4].

Метою роботи було дослідження маркерів хронічної гіпоксії та окисного стресу як критеріїв активності мікробного запалення та його перебігу у дітей з хронічним пієлонефритом.

Матеріал і методи дослідження

У нефрологічному відділенні ДКЛ №7 було обстежено 23 дитини у віці від 1 року до 17 років з різними формами хронічного пієлонефриту, з них 14 пацієнтів знаходились у стадії клініко-лабораторної ремісії, а 9 мали загострення хронічного пієлонефриту та отримували антибактеріальну терапію. Всім дітям проводилось загальноклінічне обстеження: загальний аналіз крові та сечі, аналіз сечі за Нечипоренком, біохімічний аналіз крові, ультразвукове обстеження нирок, добове моніторування артеріального тиску, мікційна цистографія. Стан функції нирок оцінювали шляхом розрахунку швидкості клубочкової фільтрації за формулою Шварца та проведенням реносцинтиграфії.

Рівні $\text{HIF-1}\alpha$ визначались у плазмі крові обстежених дітей. Плазму розводили в буфері (50 мМ Tris/HCl (рН 7,4), 50 мМ NaCl , 1 мМ EDTA , 0,5 мМ дитіотреїтол, 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

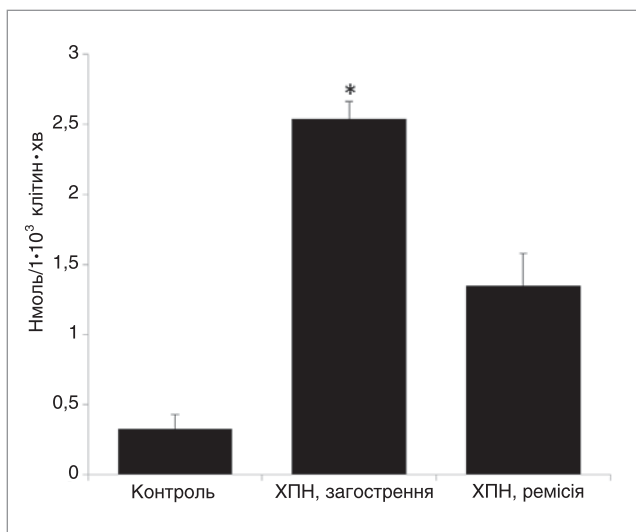


Рис. 1. Рівні запальної активації нейтрофільних гранулоцитів крові у дітей залежно від активності хронічного пієлонефриту

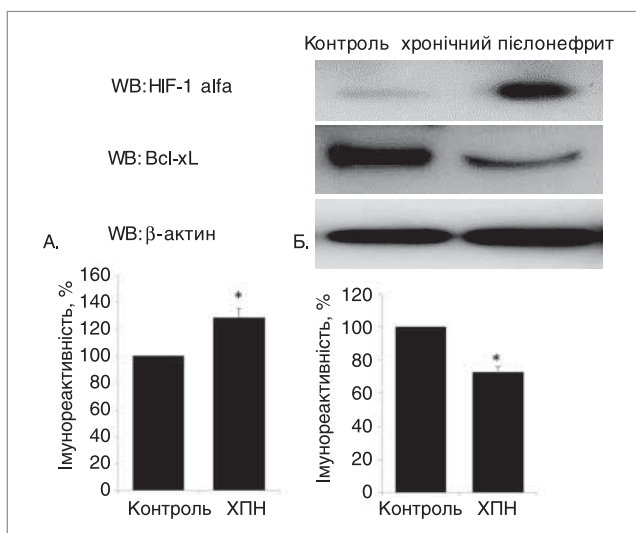


Рис. 2. Рівні маркера гіпоксії та антиапоптозного захисту у дітей з хронічним пієлонефритом: А — імунореактивність HIF-1α у дітей з пієлонефритом (ХПН); Б — імунореактивність Bcl-xL (імунореактивність в групі контролю прийнята за 100%); * — $p < 0,01$

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

Вперше в даній когорті було вивчено рівень окисних пошкоджень за ступенем активації нейтрофільних гранулоцитів крові шляхом дослідження швидкості генерування супероксидних радикал-аніонів (O_2^-) методом електронного парамагнітного резонансу з використанням спінового уловлювача 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidine hydrochloride (TEMPONE-H).

Визначення рівнів HIF-1α в плазмі крові та Bcl-xL в компонентах крові обстежених дітей проводили методом Western Blotting. Електрофорез проводили в 7,5% поліакриламідному гелі з наступним трансфером на полівінілдендифлюоридні мембрани. Блокування мембран проводили в 5% знежиреному молоці на TBS-T (136 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% Tween 20) з наступною інкубацією з первинним антитілами, — Mouse anti-Human HIF-1α Ab (BD Transduction Laboratories, 1:500) чи Mouse anti-Bcl-xL Ab (Cell Signaling, 1:500) протягом 12 год при 4°C. В якості

вторинних антитіл використовували Anti-mouse horseradish peroxidase Ab (GE Healthcare) в концентрації 1:3000 з інкубуванням протягом 1 год при кімнатній температурі. Мембрани відмивались TBS-T, після чого візуалізація білків проводилась хемілюмінесцентно з використанням хемілюмінесцентного субстрату ECL (GE Healthcare). Результати дослідження порівнювались з показниками 16 умовно здорових дітей без захворювання нирок.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0. Для порівняння відмінностей груп використовували непараметричний аналіз (Mann-Whitney test). Величини представлені як Mean ± SEM. Значення $p < 0,05$ вважали статистично достовірним.

Результати дослідження та їх обговорення

Клітинні реакції, які беруть участь у реалізації цього запалення, включають в себе активацію, міграцію, адгезію прозапальних клітин (нейтрофілів, моноцитів/макрофагів, лімфоцитів) з реалізацією широкого спектру медіаторів запалення, включаючи молекули адгезії, протеази, ферменти, вільні радикали кисню, хемокіни, фактори росту, про- і протизапальні цитокіни [5,7].

Дослідження рівнів активації нейтрофілів у крові у дітей з хронічним пієлонефритом виявило достовірне прискорення швидкості генерування супероксидних радикал-аніонів (O_2^-) (рис. 1). У групі контролю швидкість генерування супероксидних радикал-аніонів (O_2^-) становила $0,33 \pm 0,10$ нмоль/1х10³ клітин·хв. При цьому ступінь запальної активації клітин залежав від активності процесу. Більш виразні зміни зафіксовані у хворих на хронічний пієлонефрит, що перебували у стадії загострення ($2,54 \pm 0,12$ нмоль/1х10³ клітин·хв проти $1,35 \pm 0,23$ нмоль/1х10³ клітин·хв у групі з хронічним пієлонефритом в стадії ремісії, $p < 0,01$).

Окисний стрес розвивається як результат дисбалансу між рівнем продукції радикальних форм кисню та станом активності антиоксидантного захисту. Розвиток окисного стресу ініціює наступні сигнальні реакції, пов'язані з активацією клітинної сигналізації, що запускають апоптоз клітин, зниження їх регенеративної здатності, фіброз. Ці фактори мають стохастичний пошкоджуючий вплив на функцію нирок.

Генеровані в електронотранспортному ланцюзі мітохондрій та іншими джерелами супероксидні радикали ініціюють пошкодження внаслідок вторинного продукування перекису водню, гідроксильних радикалів, пероксинітриду. Ряд ферментів, що функціонують у мембранах мітохондрій, чутливі до окисних пошкоджень, а порушення їх функціонування проявляється дефіцитом синтезу АТФ, що формує розвиток клітинної гіпоксії, зростання рівнів РФК, дизрегуляцію транспорту кальцію, зміни проникності мітохондріальних транзитних пор [6]. Одним з наслідків цих порушень є загибель клітин за сценарієм некрозу або апоптозу.

Для визначення рівня гіпоксичних пошкоджень були досліджені рівні HIF-1α в плазмі крові дітей з хронічним пієлонефритом. Отримані результати свідчили про наявність високих рівнів показника в усіх дітей з пієлонефритом порівняно з групою контролю. Так, у дітей з пієлонефритом рівень HIF-1α перевищував показник групи контролю на 28,82% ($p < 0,01$) (рис. 2А).

Контроль апоптозу здійснюється рядом факторів прота антиапоптозного спрямування дії та залежить від їх балансу [11]. Основні регулювальні функції з апоптозу та життєвого циклу клітини відіграє родина факторів Bcl.

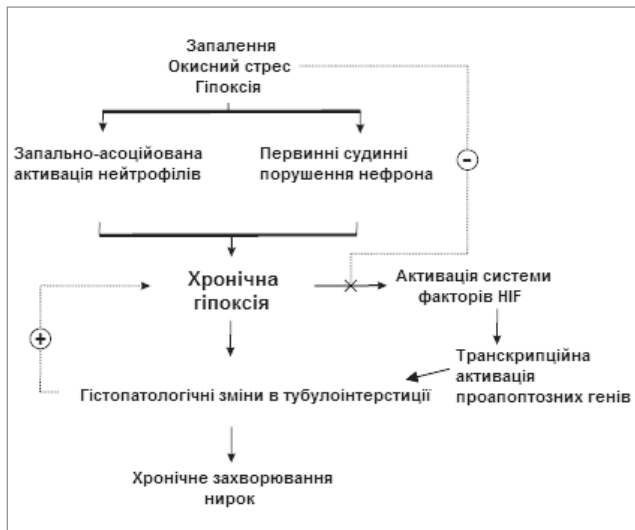


Рис.3. Схема гіпоксія-індукованих порушень у розвитку пошкодження нирок при хронічному пієлонефриті

Представники родини Bcl належать до двох підгруп: Bcl-2-підгрупа, до якої належать антиапоптотні фактори, такі як Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-B/Diva/Boo; Вах-підгрупа, яка включає проапоптотні Вах, Ваk, Ваd. Механізм дії підгрупи Bcl-2 білків полягає у розвитку міжбілкових взаємодій та гетеродимеризації. Bcl-2 забезпечує підтримку мембрани та супресію виходу цитохрому с з мітохондрій, що забезпечує виживання клітини. Bcl-xL, гомолог Bcl-2, фізично взаємодіє з Араf-1, що попереджує активацію каспаз. При цьому інгібується каспазний шлях активації апоптозу [9,10]. У зв'язку з цим вивчався рівень фактору антиапоптотного захисту Bcl-xL у плазмі крові усіх дітей з хронічним пієлонефритом. Доведено значне зниження показників експресії Bcl-xL, визначеного методом Western Blotting, при пієлонефриті порівняно з групою контролю.

У дітей з хронічним пієлонефритом рівень експресії Bcl-xL був нижчим, ніж в групі контролю, на 27,34% (p<0,01) (рис. 2Б).

Клітинна гіпоксія є причиною структурних та функціональних розладів в межах тубуло-інтерстиціального апарату нирок, у тому числі недостатності капілярного кровотоку, порушення перитубулярного кровотоку внаслідок гломерулярних пошкоджень еферентних артеріол.

Вазоконстрикція розвивається як результат вторинних окисно-індукованих активацій ендотеліна-1 (ЕТ-1), NO, що залежать від гіпоксії. Результатом останнього є неадекватність кровотоку в гломерулярному та тубулярному сегментах. Як результат судинних розладів на рівні нефрону, хронічна гіпоксія прогресує. Цьому сприяють посилене споживання кисню при гіперфільтрації та зниження дифузії кисню у результаті експансії зовнішньоклітинного матрикса [11].

Вплив гіпоксії на прогресування порушення функції нирок при хронічному пієлонефриті у кінцевому підсумку проявляється, насамперед, структурними порушеннями, зокрема неадекватним функціональним станом перитубулярних капілярів, що обумовлює, в свою чергу, недостатність постачання кисню до тубулярних клітин. Останнє призводить до розвитку залежних порушень — до зниження тиску кисню та капілярної гіперперфузії, що супроводжуються внутрішньоклітинною гіпоксією, яка одночасно є причиною подальшого наростання гіпоксичних пошкоджень [12,13]. Внутрішньоклітинна гіпоксія виступає в ролі регулятора клітинних функцій як специфічний стимул для активації ряду генів, у тому числі дисрегуляції балансу факторів про- та антиапоптотного захисту, що було виявлено у дітей з хронічним пієлонефритом. На рис. 3 представлена загальна схема гіпоксія-індукованих порушень у розвитку пошкодження нирок при хронічному пієлонефриті.

Висновки

1. Хронічний пієлонефрит супроводжується формуванням клітинної гіпоксії та індуцією апоптозу через наростання швидкості генерування супероксидних радикалів нейтрофілами, підвищення рівня індукованого гіпоксією фактора HIF-1α та зниження активності фактора системи антиапоптотного захисту Bcl-xL.
2. Рівень індукованого гіпоксією фактора HIF-1α та зниження активності фактора системи антиапоптотного захисту Bcl-xL можуть використовуватись як предиктори перебігу захворювання та функціонального стану нирок у дітей з хронічним пієлонефритом.
3. Визначення зазначених показників допоможе обрати додаткові патогенетично обґрунтовані терапевтичні засоби впливу на патологічний процес в нирках для уповільнення його прогресування, а їх моніторинг в динаміці пієлонефриту дозволить оцінити ефективність терапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Perspective in chronic kidney disease: targeting hypoxia-inducible factor (HIF) as potential therapeutic approach / A. B. Deshmukh, J. K. Patel, A. R. Prajapati, S. Shah // *Ren. Fail.* — 2012. — Vol. 34. — P. 521—532.
2. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia response and the progression of chronic kidney disease / S. N. Heymann, M. Khamaisi, S. Rosen [et al.] // *Am. J. Nephrol.* — 2008. — Vol. 28. — P. 998—1006.
3. Silverstein D. M. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease / D. M. Silverstein // *Pediatr. Nephrol.* — 2009. — Vol. 24. — P. 1445—1452.
4. Brown S. A. Oxidative stress and chronic kidney disease / S. A. Brown // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* — 2008. — Vol. 38. — P. 157—166.
5. Theilig F. Spread of glomerular to tubulointerstitial disease with a focus on proteinuria / F. Theilig // *An. Anat.* — 2010. — Vol. 192. — P. 125—132.
6. Apel K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // *An. Rev. Plant. Biol.* — 2004. — Vol. 55. — P. 373—399.
7. Eckardt K. U. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease / K. U. Eckardt, W. M. Bernhardt, A. Weidemann [et al.] // *Kidney Int. Suppl.* — 2005. — P. 46—51.
8. Fine L. G. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney disease: from hypothesis to novel therapeutics / N. G. Fine, J. T. Norman // *Kidney Int.* — 2008. — Vol. 74. — P. 867—872.
9. Dewson G. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease / G. Dewson, M. R. Kluck // *Cell Health Cytoskeleton.* — 2010. — Vol. 29. — P. 11—22.
10. Wei Y. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis / Y. Wei, F. Fan, M. Yu // *Acta Biochim. Biophys.* — 2008. — Vol. 40. — P. 279.
11. Palm F. Renal tubulointerstitial hypoxia: Cause and consequence of kidney dysfunction / F. Palm, L. Nordquist // *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol.* — 2011. — Vol. 38. — P. 474—480.
12. Rodriguez-Iturbe B. The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure / B. Rodriguez-Iturbe, G. Garcia // *Nephron Clin. Pract.* — 2010. — Vol. 116. — P. 81—88.

КЛЕТОЧНАЯ ГИПОКСИЯ КАК МЕХАНИЗМ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ*1В.Г. Майданник, 1,2Е.А. Бурлака, 3И.В. Багдасарова, 3О.В. Лавренчук (Киев)*¹ Национальный медицинский университет имени А.А. Богомолца, Киев, Украина² Каролинский институт, Стокгольм, Швеция³ГУ «Институт нефрологии НАМН Украины», Киев, Украина

Цель: исследование маркеров хронической гипоксии и окислительного стресса как критериев активности микробного воспаления и его течения у детей с хроническим пиелонефритом.

Пациенты и методы. В условиях стационара обследовано 23 ребенка в возрасте от 1 года до 17 лет с разными формами хронического пиелонефрита, из них 14 пациентов находились в стадии клинико-лабораторной ремиссии, а 9 — в стадии обострения и получали антибактериальную терапию. Обследование включало общий анализ крови и мочи, анализ мочи по Нечипоренко, биохимический анализ крови, ультразвуковое обследование почек, суточное мониторирование артериального давления, микционную цистографию. Состояние функции почек оценивали путем расчета скорости клубочковой фильтрации по формуле Шварца и проведения реносцинтиграфии.

Результаты. Установлено, что развитие заболевания сопровождалось ростом скорости генерирования супероксидных радикалов Nox2 нейтрофилов, повышением уровня индуцированного гипоксией фактора HIF-1 α и снижением активности фактора системы антиапоптозной защиты Bcl-xL. Выявлена зависимость степени нарушения уровней изучаемых показателей от стадии заболевания и доказана целесообразность их использования в качестве предикторов неблагоприятного течения пиелонефрита.

Выводы. Определение маркеров хронической гипоксии и окислительного стресса поможет подобрать патогенетически обоснованные терапевтические средства и тем самым замедлить прогрессирование патологического процесса в почках, а их мониторинг в динамике позволит оценить эффективность терапии.

Ключевые слова: хронический пиелонефрит, дети, клеточная гипоксия, воспаление, апоптоз, Bcl-xL.

CELLULAR HYPOXIA AS A MECHANISM OF RENAL DISORDERS DURING THE CHRONIC PYELONEPHRITIS IN CHILDREN*1V.G. Maydannik, 1,2 E.A. Burlaka, 3I.V. Bagdasarova 3O.V. Lavrenchuk (Kiev)*¹ A.A. Bogomolts National Medical University, Kiev, Ukraine² Karolinskyi Institute, Stockholm, Sweden³ SU «Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine», Kiev, Ukraine

Objective: To study the markers of chronic hypoxia and oxidative stress as a criterion of microbial activity of inflammation and its course in children with chronic pyelonephritis.

Patients and methods. In the hospital were examined 23 children aged from 1 year to 17 years with various forms of chronic pyelonephritis, the 14 of which were in the stage of clinical and laboratory remission and 9 — in the stage of acute condition and received antibiotic therapy. The examination included a general analysis of blood and urine tests, Nechiporenko's urine test, biochemical blood assay, ultrasound examination of the kidneys, 24-hour monitoring of blood pressure, voiding cystography. State of kidney function was evaluated by the way of calculating the glomerular filtration rate by the Schwartz formula and the conduct of renoscintigraphy.

Results. It is found that the development of the disease accompanied by increased generation rate of superoxide radicals Nox2 neutrophils, increased levels of hypoxia-induced factor HIF-1 α and decreased activity factor of anti-apoptotic protection Bcl-xL. The dependence of the degree of disorders of the levels of the studied parameters on the stage of the disease is found and proved the feasibility of their use as predictors of an unfavorable course of pyelonephritis.

Conclusions. Determination of markers of chronic hypoxia and oxidative stress will help to choose pathogenesis-based treatment preparations and thus slow down the progression of the pathological process in the kidneys, and their monitoring in dynamics will assess the effectiveness of therapy.

Key words: chronic pyelonephritis, children, cellular hypoxia, inflammation, apoptosis, Bcl-xL.