

Soc. Artif. Intern. Organs. 1984; 30; 21.

88. **Winearls C., Oliver D., Pippard M.** et al. Effects of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic hemodialysis. *Lancet* 1986; 2:8517, 1175-8.

89. **Wolcott D., Marsch J., La Rue A.** Recombinant human erythropoietin treatment may improve quality of life and cognitive function in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1989; 14; 478.

90. **Wolcott D., Nissenson A., Landswerk J.** Quality of life in chronic dialysis patients. Factors unrelated to dialysis modality. *General Hospital Psychiatry.* 1988; 10; 2647.

91. **Wolcott D., Nissenson A.** Quality of life in chronic dialysis patients: a critical comparison of continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 1988; 9; 402.

92. **Wolcott D., Schweitzer S., Marsh J.** Recombinant erythropoietin improves cognitive function and quality of life (QL) of chronic hemodialysis patients. (Abstract). *Kidney Int.* 1988; 33; 242.

93. **Wuerth D.B., Finkelstein S.H., Juergensen D.M. et al.** Quality of life assessment in chronic peritoneal dialysis patients. *Adv.*

Perit. Dial. 1997; 13; 125-7.

Апоптоз в патогенезе нефропатий

Ф.Д. Цаликова

МНИИ педиатрии и ДХ МЗ РФ, отдел наследственных и приобретенных заболеваний почек

Apoptosis In Mecanisms Of Kidney Diseases

F.D. Calikova

Ключевые слова: апоптоз, гломерулосклероз, нефрит, нефропатия, почки.

Апоптоз, чаще называемый программированной смертью клетки, является энергетически активным, генетически контролируемым процессом, который избавляет организм от ненужных или поврежденных клеток [1]. Этот процесс впервые описан в 1972 г. Керг под названием «программированная клеточная гибель» [22]. Происхождение самого термина относится к 1993 г., когда Грек предложил его в соответствии со смысловой ассоциацией со словом «листопад» [20].

Апоптоз регулируется как факторами внешней среды, так и внутриорганизменными, и выполняет роль биологических часов клетки, отсчитывающих время ее жизни [40]. В здоровом взрослом организме клеточный гомеостаз определяется балансом между клеточной гибелью и пролиферацией [32].

Примером активации апоптоза в здоровом организме является смена клеток в эмбриогенезе, в частности, в процессе органогенеза почек [20]. Формирование всех органов и, в частности, почек, основано на активации различных факторов роста в разное время: инсулиноподобного, эпидермального, факторов роста фибробластов и др. Все они ингибируют апоптоз и, таким образом, влияют на развитие почек [15].

Нарушение процесса клеточной гибели в результате воздействия как внутренних, так и внешних факторов является важным патогенетическим звеном многих патологических процессов. Супрессия, гиперэкспрессия или мутация генов, контролирующих апоптоз, связаны

с болезнью [13]. При повышении клеточной выживаемости, то есть ингибции апоптоза, развиваются рак, аутоиммунные заболевания, в том числе первичный гломерулонефрит, люпус-нефрит, IgA-нефропатия, а также вирусные инфекции, нейропролиферативные заболевания, такие как шизофрения и аутизм, и др. Понижение клеточной выживаемости, а следовательно, активация апоптоза, играет роль в патогенезе СПИДа, нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, ишемических состояний, таких как инсульт и инфаркт, диабета, интерстициального нефрита, обструктивных нефропатий, рефлюкс-нефропатии, гломерулосклероза, гидронефроза [1, 13]. Примером нарушения апоптоза в органогенезе почек являются различные дисплазии, в том числе кистозные [11, 12, 38, 39] (табл. 1).

До недавних пор считалось, что цитотоксические агенты уничтожают клетку непосредственно, но оказалось, что они индуцируют ее апоптоз [13]. Апоптоз-индуцирующее свойство токсических и физических воздействий является дозозависимым, и при увеличении дозы и экспозиции те же агенты могут индуцировать некроз [13, 20]. В патогенезе токсических повреждений печени, поджелудочной железы и почек важное значение имеет активация апоптоза [20].

Как известно, клетки могут гибнуть двумя принципиальными путями: апоптозом и некрозом [17]. Некроз – это патологический процесс, развивающийся внезапно

Таблица 1

Патологические состояния, связанные с активацией или угнетением апоптоза

Индукция апоптоза	Угнетение апоптоза
Нейродегенеративные состояния Болезнь Паркинсона Болезнь Альцгеймера	Нейропролиферативные состояния Шизофрения Аутизм
СПИД	Переносимая герпетическая вирусная инфекция Переносимая цитомегаловирусная инфекция
Ишемические повреждения инфаркт инсульт	Вирусные гепатиты В и С
Апластические и гипопластические анемии	
Токсические повреждения	
Поражения почек: нефросклероз/гломерулосклероз интерстициальный нефрит экзофронтит двупольный, в том числе кистозные полнокистозная болезнь почек гидронефроз рефлюкс-нефропатия острая почечная недостаточность	Заболевания почек: гломерулонефрит IgA-нефропатия люпус-нефрит абсцесс почки

и одновременно в большой группе клеток в результате гипоксии, физических и токсических воздействий, под действием комплемента или вируса [1]. Некроз связан с полным метаболическим коллапсом, который приводит к отеку клетки, ранней потере целостности ее мембраны, повреждению митохондрий и других органелл, что в конечном счете заканчивается лизисом остатков клетки [25]. Некроз клетки становится причиной повреждения и воспаления окружающих клеток и виден на срезе тканей. Некроз не связан с потреблением энергии и синтезом белка [37]. В то же время, апоптоз – это энергозависимый процесс, приводящий к «суициду» негодных клеток, в ходе которого в результате фрагментации ДНК их ядерный хроматин конденсируется на одинаковые по размеру цепочки. После этого клетки распадаются на так называемые «апоптотные тельца», содержащие в своем составе внешне неповрежденные митохондрии и другие органеллы. В исходе эти тельца фагоцитируются как «профессиональными», так и «непрофессиональными» макрофагами, роль которых выполняют соседние клетки, например, мезангиоциты или клетки тубулярного эпителия [6, 10] (табл. 2).

В процессе апоптоза клетка исчезает бесследно в течение 15-120 минут [37], и его быстротечность делает процесс трудноуловимым для исследований.

Условно апоптоз протекает в 3 этапа [32]. Первый включает взаимодействие между экстра- и интрацел-

люлярными сигналами, в результате которого решается вопрос: «жить» клетке или «нет». Второй этап включает фрагментацию ДНК, что внешне проявляется конденсацией ядерного хроматина и делением ядра. Последующий протеолиз приводит к распаду клетки на так называемые «апоптотные тельца», содержащие в своем составе внешне неповрежденные митохондрии и другие органеллы. Третий этап завершается бесследным исчезновением клетки за счет фагоцитоза «апоптотных телец» «профессиональными» и «непрофессиональными» макрофагами [28].

Биохимически апоптоз характеризуется активацией эндонуклеаз, в результате которой происходит упорядоченная фрагментация ДНК на участки в 180-200 нуклеотидных пар [4]. В отличие от этого, некроз сопровождается нерегулярной активацией

протеаз, ведущей к деградации гистонов, в результате чего ДНК превращается в мелкие нерегулярные участки [37]. На дифференцировании этих свойств основан метод идентификации апоптоза в гель-электрофорезе [18]. Это же свойство лежит в основе выявления апоптоза более современным методом, TUNEL, основанным на маркировке флуоресцентным дезоксиуридином свободных 2-цепочечных концов ДНК с применением фермента концевой дезоксирибонуклеотидной трансферазы (TdT). Метод предполагает использование иммунофлуоресценции и подсчет числа TUNEL - позитивных клеток в 1 квадратном миллиметре площади препарата. Эти методы применимы к биопсийному материалу, фиксированному в формалине и залитому в парафин. Предварительно исследуемый материал депарафинизируют и освобождают от белка добавлением К-протеинкиназы [5, 17, 18].

Наряду с указанными специальными методами исследования, апоптоз может быть выявлен также благодаря его морфологическим свойствам, выявляемым при световой и электронной микроскопии [2, 7, 21]. Окраска препаратов для световой микроскопии пропидиум – йодидом позволяет идентифицировать типичные для апоптоза пикнотические ядра [6].

Сапоптозом связаны следующие процессы в организме [1]: гибель клеток в онтогенезе; гибель клеток в здоровом взрослом организме, компенсирующая клеточ-

ную пролиферацию; гибель клеток в процессе атрофии, например, клеток коры надпочечников при воздействии глюкокортикоидов или при атрофии эндокрин-зависимых тканей; «суицид» мутантных и вирус-содержащих клеток; гибель клеток вследствие воздействия повреждающих факторов, таких как гипоксия, физические и токсические влияния внешней среды.

Морфологические и биохимические различия между апоптозом и некрозом

Таблица 2

Свойства	Апоптоз	Некроз
размер клетки	уменьшена	увеличена
проницаемость клеточной мембраны	нормальная	повышенная
внешний вид митохондрий	нормальный	поврежденный
конденсация ядерного хроматина	есть	нет
формирование из клетки «апоптотных телец»	есть	нет
выход	фагоцитоз	лизис
энергозатраты	есть	нет
вид в срезе тканей	не виден	виден
повреждение окружающих тканей	нет	есть
тип фрагментации ДНК	упорядоченный	беспорядочный

Регуляция апоптоза организмом представляет собой сложный многофакторный процесс [20]. Многие клетки имеют собственные факторы выживания, препятствующие их апоптозу [27]. Роль ингибиторов апоптоза выполняют различные факторы роста, гормоны. Так лимфоциты подвергаются апоптозу, если лишены интерлейкина-2I [9,23]. Полагают также, что апоптозу препятствует ген Bcl-2, протоонкоген, выявленный у больных лимфомой и защищающий клетки от факторов, стимулирующих апоптоз [3]. Ряд факторов, наоборот, призван индуцировать апоптоз [34]. К ним относится ген c-myc, протоонкоген, или ген ядерной транскрипции, экспрессия которого находится в прямой зависимости от пролиферации клеток [3]. Ген p53, или фактор супрессии опухолей, является сторожевым, вызывая апоптоз клеток, мутированных под действием ионизирующей радиации [8].

При нефропатиях апоптоз может иметь значение в механизмах дисэмбриогенеза и сморщивания почек. Описаны гломерулярный апоптоз, тубулоинтерстициальный апоптоз, апоптоз при аутоиммунных поражениях, апоптоз при воспалительных заболеваниях почек [20].

Нарушение апоптоза в процессе онтогенеза почек лежит в основе дисплазий, в том числе кистозных [38]. Примером может служить поликистозная болезнь почек, которая, как известно, характеризуется ростом кист в почках, интерстициальным фиброзом и постепенным снижением почечных функций [11, 12, 29, 39]. Механизмом прогрессирующего уменьшения объема почечной ткани при этой патологии является апоптоз, интенсивность которого прямо коррелирует со снижением функций почек и с сокращением массы функционирующей ткани [39].

В здоровых почках ежедневно подвергается апоптозу 3% гломерулярных клеток. Harrison указал на апоптоз как на гомеостатический механизм, приводящий гиперклеточный клубочек к нормоклеточности. Этот же автор впервые применил световую микроскопию как метод, позволяющий выявлять апоптоз при гломерулярной патологии человека [16].

При пролиферативных вариантах гломерулонефрита интенсивность апоптоза клеток клубочка достоверно коррелирует с их общим числом [2, 30, 31]. Выраженность апоптоза коррелирует также с интенсивностью протеинурии, однако это было отмечено только при мезангиопролиферативном (МезПГН) гломерулонефрите.

Исследование почечных биоптатов 19 пациентов с люпус-нефритом, 5 – с острым постстрептококковым гломерулонефритом, 5 – с идиопатическим МезПГН, 4 – с мембранозной нефропатией, 4 – с нефротическим синдромом при минимальных морфологических изменениях, 3 – с фокальным-сегментарным гломерулосклерозом и 7 здоровых людей показало, что при люпус-нефрите апоптоз в клубочках и интерстиции выражен значительно сильнее, чем при первичном гломерулонефрите. Среди пациентов с люпус-нефритом интенсивность апоптоза достоверно коррелировала с индексом хронизации [33]. Другие экспериментальные данные подтверждают, что при этом заболевании наблюдается генетически детерминированная гиперэкспрессия гена интерлейкина – 1 β m [24].

Ряд исследователей указывает на рост числа клеток,

подвергающихся апоптозу, при гломерулопатиях, протекающих с прогрессирующим гломерулосклерозом, в том числе при люпус-нефрите и IgA-нефропатии. Установлены достоверная прямая корреляция выраженности апоптоза с индексом гломерулярного склероза и его достоверная обратная корреляция с клиренсом эндогенного креатинина. Корреляции между индексом апоптоза и протеинурией, а также индексом пролиферации не найдено [18]. ДНК-диагностика выявляет активацию Fas-ligand и Bcl-2 при различных вариантах гломерулопатий. Показано, что гиперэкспрессия Bcl-2 стимулирует мезангиоциты при гломерулонефрите [3, 34, 36].

Изучение апоптоза тубулярных клеток свидетельствует о том, что одни и те же физические и токсические факторы в зависимости от дозы и экспозиции могут индуцировать апоптоз либо некроз. Так острое или очень интенсивное воздействие токсинов (например, аминогликозидов), а также гипоксия или окклюзия мочеточника вызывают острую почечную недостаточность. В то же время затяжное и мало интенсивное токсическое или гипоксическое воздействие, как и неполная обструкция мочеточников, приводят к тубулоинтерстициальному нефриту, а в ряде случаев и хронической почечной недостаточности.

В случаях острого или хронического ишемического либо токсического воздействия первичной мишенью являются тубулярные клетки [37]. В культуре тканей было показано, что гибель эпителия проксимальных канальцев под влиянием повреждающих факторов происходит через апоптоз.

При большинстве токсических воздействий тубулярный эпителий становится их мишенью, активно секреторируя и реабсорбируя токсические агенты. В опытах *in vitro* было показано, что эти воздействия сопровождаются усилением апоптоза. Так при действии хлористого кадмия на клетки проксимального канальцевого эпителия наблюдается индукция дозозависимого апоптоза, интенсивность которого угнетается действием хелаторов [13,19].

Было продемонстрировано также, что тубулоинтерстициальная атрофия после односторонней окклюзии мочеточника сопровождается апоптозом канальцевого эпителия, фагоцитируемого в конечном счете соседними тубулярными клетками. Это, в частности, было установлено в исследованиях Gobe, Aelsen и Kennedy, которые при обструкции мочеточников описали апоптоз эпителия дистальных канальцев и тубулярную атрофию [37]. Gobe наблюдал одновременно некроз и апоптоз канальцевых клеток в экспериментальной модели одностороннего стеноза почечной артерии после ее частичного сдавления [37].

Лекарственная индукция апоптоза хорошо изучена на примере нефропатии, вызываемой циклоспорином А (ЦиА) [17]. Как известно, иммуносупрессивный эффект этого препарата широко используется при лечении различных аутоиммунных состояний и, в том числе, гломерулонефритов. Фактором, ограничивающим применение ЦиА, является его нефротоксичность. Острая ЦиА-нефротоксичность обусловлена обратной вазоконстрикцией, в то время как хроническая – необратимым, прогрессирующим тубулоинтерстициальным фиброзом. Редким проявлением ЦиА-нефротоксичности является поражение почек, подобное на-

блюдаемому при гемолитико-уремическом синдроме. В эксперименте показано, что ЦИА-нефротоксичность коррелирует с активацией апоптоза, участвующего в тубулоинтерстициальном фиброзе, который частично опосредуется через эффекты Ангиотензина II и оксида азота. В частности, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и антагонисты Ангиотензин II рецепторов препятствуют развитию интерстициального фиброза и апоптоза, а продукция оксида азота активирует апоптоз и, соответственно, тубулярный фиброз [35].

В связи с ролью апоптоза в патогенезе воспалительных заболеваний почек надо отметить, что дефект захвата макрофагами лейкоцитов, подвергшихся апоптозу, часто делает воспалительный процесс в почках неконтролируемым. Ярким примером такого нарушения апоптоза лейкоцитов является абсцесс, ибо элиминация лейкоцитов путем апоптоза является основным механизмом, разрешающим воспаление [20].

Конечным результатом плохо контролируемого аутоиммунного и неаутоиммунного воспаления в почках является снижение функции почек, морфологическим субстратом которого является нефросклероз [20]. Полагают, что важную роль в формировании последнего играет активация апоптоза. С угнетением этого механизма связывают и антисклеротическое действие антигипертензивных средств в профилактике хронической почечной недостаточности [14,26].

Таким образом, изучение роли апоптоза в патогенезе нефропатий может пролить свет на механизмы их развития и хронизации и найти новые пути торможения и предупреждения раннего нефросклероза.

Литература

1. **Программированная** клеточная гибель: под ред. проф. В.С.Новикова С.Пб: Наука, 1996; 276.
2. **Baker A.J., Mooney A., Hughes J., Lombardi D., Johnson R.J., Savill J.:** Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J. Clin. Invest* 1994; 94: 2105-2116.
3. **Bissonnette R.P., Echeverri F., Mahoubi A., Green D.R.:** Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.
4. **Bortner, C.D., Oldenberg N.B.E., and J.A. Cidlowski:** The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1995; 5: 21-26.
5. **Cavrieli Y., Y.Sherman, and S.A.Ben-Sasson:** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J.Cell Biol.* 1992; 119: 493-501.
6. **Cohen J.J.:** Apoptosis. *Imunol. Today* 1993; 14:126-130.
7. **Coles H.S.R., Burne J.F., Raff M.C.:** Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 1993; 118: 777-784.
8. **Cummings M.C.:** Increased p53 mRNA expression in liver and kidney apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1996; 1315; 2: 100-4.
9. **Duke R.C., Cohen J.J.:** IL-2 addiction: Withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 1986; 5: 289-294.
10. **Earnshaw W.C.:** Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7: 337-343
11. **Grantham J.J.:** Polycystic kidney disease: huge kidneys, huge problems, huge progress. *Transactions of the Am. Clin. and Climatological association* 1996; 108: 165-70; discussion 170-2.
12. **Grantham J.J.:** The etiology, pathogenesis and treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advanced. *Amer. J. of Kidney Diseases* 1996; 28: 6, 788-803.
13. **Hamada T., Sasaguri T., Tanimoto A.:** Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium- metallothionein. *Biophysical Research Communications* 1996; 219; 3:829-34.
14. **Hamet P., Richard L., Dam T.V.:** Apoptosis in target organs of hypertension. *J.Hypertension* 1995; 26; 4: 642-8.
15. **Hammerman:** Growth factors in renal development *Seminars in Nephrology* 1995; 15; 4: 291-9.
16. **Harrison D.J.:** Cell death in the diseased glomerulus. *Histopathology* 1988; 12: 679-683.
17. **Healy A., M. Dempsey, C. Lally and M.P. Ryan:** Apoptosis and necrosis: Mechanisms of cell death induced by Cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney International*, 1998; 54; 1955-1966.
18. **Hitoshi Sugiyama, NaokiKashihara, Hirofumi Makino, Yasushi Yamasaki, and Zensuke Ota:** Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney International*, 1996; 49; 103-111.
19. **Jan H., Carter C.E., Xu C.:** Cadmium induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by helators. *J. Toxicology and Environmental Health.* 1997; 52; 2: 149-68.
20. **John Savill:** Apoptosis and the Kidney. *J.Am.Soc Nephrol.* 1994; 5: 12-21.
21. **Johnson R.J., Alpers C.E., Pruchno C., Schulze M., Baker P.J., Pritzl P., Couser W.G.:** Mechanisms and kinetics for platelet and neutrophil localization in immune complex nephritis. *Kidney Int.* 1989; 36: 780-789.
22. **Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R.:** Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239-257.
23. **Koury M.J., Bondurant M.C.:** Eritropoetin retards DNA breakdown and prevents programmed death in eritroid progenitor cells. *Science* 1990; 246: 378-380.
24. **Lemay S., Mao C., Singh A.K.:** Cytokine gene expression in the MRL/lpr model of lupus nephritis. *Kidney Int.* 1996; 50; 1: 85-93.
25. **Majno G. and Joris I.:** Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 3-15.
26. **Ono H., Ono Y.:** Nephrosclerosis and hypertension. *Medical Clinics of North America* 1997; 81; 6: 1273-88.
27. **Raff M.C.:** Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400.
28. **Savill J., Smith J., Sarraf C., Ren Y., Abbott F., Rees A.J.:** Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Intern.* 1992; 42: 924-936.
29. **Sessa A., Ghiggeri G.M., Turco A.E.:** Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. *J. of Nephrology* 1997; 10; 6: 295 - 310.
30. **Shimizu A., Kitamura H., Masuda Y., Ishizaki M., Sugisaki Y., Yamanaka N.:** Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1995; 47: 114-121.
31. **Shimizu A., Kitamura H., Masuda Y.:** Rare glomerular capillary regeneration and subsequent capillary regression with endothelial cell apoptosis in progressive glomerulonephritis. *Am. J. of Pathology.* 1997; 151; 5: 1231 - 9.
32. **Solary E., Dubrez L., Eymin B.:** The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *European Respiratory* 1996; 9; 6: 1293-305.
33. **Soto H., Mosquera J., Rodriguez-Iturbe B.:** Apoptosis in proliferative glomerulonephritis: decreased apoptosis expression in LN. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 1997; 12; 2: 273-80.
34. **Suda T., Takahashi T, Golstein P, Nagata S.:** Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178.
35. **Susan E.Thomas, Takeshi F. Andoh, Raimund H. Pichler, Stuart J.Shankland, William G.Couser, William M.Bennett, and Richard J.Johnson:** Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney International.* 1998; 53; 697-908.
36. **Takemura T., Murakami K., Miyazoto H.:** Expression of Fas ANTIGEN AND Bcl-2 in human glomerulonephritis. *Kidney International* 1995; 48; 6: 1886-92.
37. **Wilfred Lieberthal and Jerrold S.Levine:** Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am.J.Physiol.* 271 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 40):F477-F488, 1996.
38. **Wynsard P.J., Nauta J., Lirenman D.S.:** Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney International* 1996, 49; 1: 135-46.
39. **Woo D.:** Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333; 1: 56-7.
40. **Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R.:** Cell death: The significance of apoptosis *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.