

та развития ВГПТ составила около 10% в год, и она нарастала с увеличением срока диализного лечения.

Литература

1. Волгина Г.В., Перепеченых Ю.В. Паратиреоидный гормон – универсальный уремический токсин. Нефрология и диализ 2000; 2: 1–2.
2. Ермаленко В.М. Фосфорно-кальциевый обмен и почки: Руководство для врачей. Под ред. И.Е. Тареевой, 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2000: 62–75.
3. Aterini S, Salvadori M, Ippolito E. et al. The role of vitamin D receptor alleles in the secondary hyperparathyroidism of hemodialysis patients. J Nephrol 1996; 9: 201–206.
4. Dusso AS, Pavlopoulos T, Naumovich L. et al. P21(WAF1) and transforming growth factor-alpha mediate dietary phosphate regulation of parathyroid cell growth. Kidney Int 2001; 59: 855–865.
5. Falchetti A, Bale AE, Amorosi A. et al. Progression of uremic hyperparathyroidism involves allelic loss on chromosome 11. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76: 139–144.
6. Fernandez A, Fibla J, Betriu A, Piulats JM, Almirall J, Montoliu J. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hypoparathyroidism in patients with chronic renal failure. J Am Soc Nephrol 1997; 8: 1546–1552.
7. Fukagawa M, Kitaoka M, Yi H, Fukuda N, Matsumoto T, Ogata E. Serial evaluation of parathyroid size by ultrasonography is another useful marker for the long-term prognosis of calcitriol pulse therapy in chronic dialysis patients. Nephron 1994; 68: 221–228.
8. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. J Clin Invest 1993; 92: 1436–1442.
9. Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovannini M, Sarfati E, Druke T.B. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with primary or secondary uremic hyperparathyroidism. Kidney Int 1997; 51: 328–336.
10. Gogusev J, Duchambon P, Stoermann-Chopard C, Giovannini M, Sarfati E, Druke T.B. De novo expression of transforming growth factor-alpha in parathyroid gland tissue of patients with primary or secondary uremic hyperparathyroidism. Nephrol Dial Transplant 1996; 11: 2155–2162.
11. Magnitude and impact of abnormal mineral metabolism in hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). Am. J Kidney Dis. 2004; Suppl. 44 (5).
12. Matsushita H, Hara M, Endo Y. et al. Proliferation of parathyroid cells negatively correlates with expression of parathyroid hormone-related protein in secondary parathyroid hyperplasia. Kidney Int 1999; 55: 130–138.
13. Naveh-Many T, Rabamimov R, Livni N, Silver J. Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. J Clin Invest 1995; 96: 1786–1793.
14. Roussanne M.C., Lieberherr M., Souberbielle J.C., Sarfati E., Druke T., Bourdeau A. Human parathyroid cell proliferation in response to calcium, NPS R-467, calcitriol and phosphate. Eur J Clin Invest 2001; 31: 610–616.
15. Slatopolsky E, Finch J, Denda M. et al. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth: high phosphorus directly stimulates PTH secretion *in vitro*. J Clin Invest 1996; 97: 2534–2540.
16. Tabara H, Yasuo Y, Yamada T, Tsujimoto Y. et al. Rare Somatic Inactivation of the Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Gene in Secondary Hyperparathyroidism of Uremia. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 4113–4117.
17. Yokoyama K, Shigematsu T, Tsukada T. et al. Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease. Kidney Int 1998; 53: 454–458.

Активность апоптоза лимфоцитов при хроническом гломерулонефрите*

О.Ю. Варга, Л.М. Хейфец, Т.О. Волкова, М.М. Кручек

Петрозаводский государственный университет, кафедра госпитальной терапии, г. Петрозаводск

Lymphocyte apoptosis activity in chronic glomerulonephritis

O.Yu. Varga, L.M. Cheyetz, T.O. Volkova, M.M. Kruchek

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, лимфоциты, апоптоз, программированная клеточная гибель, фрагментация ДНК, характер повреждений ДНК, 1- и 2-нитевые разрывы ДНК, каспазы 6, 8.

Цель исследования: изучение активности апоптоза лимфоцитов при хроническом гломерулонефрите (ХГН).

Материал и методы: в лимфоцитах 32 больных ХГН и 12 здоровых доноров методом флюоресценции исследована активность каспаз 6 и 8 с использованием специфических субстратов каспаз и количество 2- и 1-нитевых разрывов ДНК с применением двух ДНК-тропных красителей – этидиума бромид и 4,6-диамидино-2-фенилиндола. Изучена зависимость активности апоптоза лимфоцитов от показателей

*Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МК-1814.2004.7.

Адрес для переписки: 185026, г. Петрозаводск, ул. Ровио, д. 17/2, кв. 124. Варга О.Ю.

Телефон: (8142) 76-44-45

E-mail: olvar@karelia.ru

активности заболевания. Проанализирована динамика активности апоптоза лимфоцитов на фоне иммуносупрессивной терапии.

Результаты: выявлено повышение активности каспаз у больных ХГН по сравнению со здоровыми донорами. Получена корреляционная связь между показателями активности ХГН (суточной протеинурией, гиперхолестеринемией) и активностью апоптоза лимфоцитов. Констатируется дальнейшее повышение активности апоптоза лимфоцитов на фоне иммуносупрессивной терапии ХГН. Выявлена зависимость активности апоптоза лимфоцитов от давности ХГН, наличия хронической почечной недостаточности. Показана зависимость эффективности иммуносупрессивной терапии от исходной активности апоптоза лимфоцитов.

Заключение: согласно полученным данным при ХГН имеет место нарушение процессов апоптоза лимфоцитов, что, возможно, имеет значение в патогенезе заболевания, а именно – в образовании клонов потенциально аутоагрессивных лимфоцитов. Современные варианты иммуносупрессивной терапии ХГН не приводят к нормализации данного процесса, что может лежать в основе недостаточно успешного лечения данного заболевания.

More information is needed to evaluate the role of programmed cell death in pathogenesis of autoimmune disorders such as chronic glomerulonephritis. It is important to reveal how apoptosis is regulated and what can we do to suppress the process. The aim of this investigation was: 1) estimation of the activity of lymphocytes programmed death in patients with chronic glomerulonephritis; 2) study of dependence of apoptosis activity on duration and severity of the diseases and the presence of chronic renal failure; 3) evaluation of side effect of immunosuppressive drugs on this process. The main task of this work is elaboration of chronic glomerulonephritis therapy taking into account drugs influence on lymphocytes apoptosis. Patients with chronic glomerulonephritis have increased programmed lymphocyte death activity in comparison with healthy donors. There is correlation between the duration and activity of the disease, presence of chronic renal failure and lymphocyte apoptosis activity. Therapy of chronic glomerulonephritis with glucocorticosteroids, cyclophosphan does not normalise the programmed lymphocyte death activity.

Введение

Апоптоз, или запрограммированная гибель клетки, является естественным процессом, представляющим собой основной компонент эмбриогенеза, морфогенеза и роста тканей. Использование этих двух терминов как равнозначных сохраняется до настоящего времени. Запрограммированная клеточная гибель – понятие биохимическое, обозначающее активную форму клеточной смерти, являющуюся результатом реализации ее генетической программы или ответом на внешние сигналы и требующую затрат энергии и синтеза макромолекул *de novo*. Апоптоз – понятие морфологическое, форма гибели клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Несмотря на то что фактор запрограммированности и активный характер гибели обычно являются более принципиальными, чем сопутствующие ей морфологические изменения, чаще используется термин «апоптоз» [12].

Запрограммированная клеточная гибель является результатом баланса про- и противоапоптозных факторов. К наиболее важным регуляторам этого процесса относятся рецепторы гибели клетки (Fas, TNF), каспазы, митохондрии, семейство протоонкогенов Bcl-2, отдельные опухоль-подавляющие гены [3, 8, 9].

После получения сигнала к апоптозу в клетке происходит два последовательных события: первое – немедленное – развивается в мембране с участием рецепторов гибели клетки, второе – в течение нескольких часов приводит к ее уничтожению и заключается в активации каскада внутриклеточных протеаз – каспаз [12]. Первая группа каспаз – «начальные» ферменты (каспазы 8, 9, 10) – необходима для начала и распространения сигнала клеточной гибели, вторая группа – «каспазы-палачи» (каспазы 2, 3, 6, 7) – вовлекается в стремительный процесс расщепления структурных компонентов и элементов жизнеобеспечения клетки, участвующих в регуля-

ции межгенных взаимодействий, восстановлении ДНК и ядерной мембраны, третья категория каспаз (каспазы 1, 4, 5, 13) может быть вовлечена в равной степени в процесс клеточной смерти и воспаления [3, 8, 9, 12, 13].

Апоптоз является тем механизмом, который обуславливает элиминацию лимфоцитов с дефектной перестройкой генов или неадекватной специфичностью рецепторов. Она составляет сущность отрицательной селекции потенциально аутоагрессивных лимфоцитов. Хотя зрелые лимфоциты и другие клетки иммунной системы устойчивы к индукции запрограммированной клеточной гибели, они становятся чувствительными к ней после активации: дисбаланс стимулирующих сигналов, включая дефицит ростовых факторов, повторная стимуляция и просто старение активированных клеток приводят к развитию апоптоза [3, 8, 12, 15].

В последнее время большое внимание уделяется изучению апоптоза с точки зрения влияния его на различные патологические процессы. Наиболее вероятно, что апоптоз в отличие от некроза не является обязательной составляющей типовых патологических процессов, скорее можно говорить о нарушениях самого апоптоза как основе ряда заболеваний. Снижение интенсивности запрограммированной клеточной гибели приводит к развитию злокачественных новообразований, инфекционного воспаления. Наряду с этим существует целый ряд патологических состояний, вызванных активацией апоптоза. Повышенная предрасположенность к апоптозу лимфоцитов и усиление экспрессии Fas-L гранулоцитами выявлено у больных системной красной волчанкой; в результате быстрой гибели нейронов возникают болезни Альцгеймера и Паркинсона; при инфаркте миокарда или инсульте происходит лизис клеток вокруг очага ишемии, что приводит к расширению зоны поражения; в гепатоцитах, пораженных вирусом гепатита С, определяется повышенная экспрессия Fas, что является причиной их быстрой гибели под воздействием цитотоксических

T-лимфоцитов [8, 12, 14, 15, 18].

Большой интерес представляют данные о значении апоптоза в развитии различного рода нефропатий, прогрессирование которых характеризуется одной общей особенностью – клеточной пролиферацией с накоплением внеклеточного матрикса и последующим сморщиванием ткани. При этом компоненты матрикса влияют на чувствительность мезангия к различным индукторам апоптоза, что приводит к значительным потерям гломерулярных клеток и развитию гломерулосклероза. Однако недостаточность почечных функций определяется не только гломерулосклерозом, но и наличием тубулоинтерстициальных нарушений, при этом разрушение клеток канальцевого эпителия, наряду с некрозом, может происходить и путем апоптоза. Установлено, что при ингибции апоптоза развивается первичный гломерулонефрит, люпус-нефрит, IgA-нефропатия, интенсивность апоптоза клеток клубочка достоверно коррелирует с их общим числом, а также – при мезангиопролиферативном варианте хронического гломерулонефрита – интенсивностью протеинурии [14]. Активация апоптоза играет роль в развитии гломерулосклероза, кортикального некроза, обструктивных нефропатий, рефлюкс-нефропатии, поликистоза, гидронефроза, интерстициального нефрита, в том числе циклоспориновой нефропатии, посттрансплантационной острой почечной недостаточности [2, 10, 14].

Большое значение имеют процессы запрограммированной смерти T-лимфоцитов: гибель этих клеток с использованием механизма апоптоза играет большую роль в развитии лимфопении при хронической почечной недостаточности. Известно также, что циклоспорин и глюкокортикоиды вызывают апоптоз так называемых митоген-активируемых мононуклеаров, причем эта способность коррелирует с их иммунодепрессивной активностью [2]. Выявлено положительное влияние апоптоза на выживаемость почечного трансплантата у крыс: животные, получавшие иммуносупрессивную терапию эверолимусом, не имели признаков хронической нефропатии аллографта благодаря антипролиферативному и проапоптозному действию препарата [12].

В настоящее время известно, что конечным этапом действия противоопухолевых лекарственных препаратов является включение в клетках опухоли программы апоптоза и дальнейшие резервы повышения эффективности терапии заболеваний, в том числе онкогематологического профиля, связаны с изучением биологических основ противоопухолевой терапии и совершенствованием ее на основании этих данных [1, 16, 17]. В связи с этим представляет интерес вопрос влияния иммуносупрессивной терапии на активность апоптоза лимфоцитов и зависимость эффективности иммуносупрессивной терапии от исходной активности апоптоза лимфоцитов.

Целью настоящего исследования явилось изучение выраженности апоптоза лимфоцитов при ХГН, зависимости ее от активности заболевания, динамики на фоне иммуносупрессивной терапии, эффективности терапии в зависимости от исходной степени апоптоза лимфоцитов.

Материал и методы

В исследование нами включено 32 больных ХГН в возрасте от 17 до 63 лет (в среднем $34,4 \pm 15,08$ года) с длительностью заболевания от дебюта до 18 лет (в среднем $3,48 \pm 4,16$ года). В дебюте заболевания исследовано 12 больных, остальные пациенты – на момент констатации активности (рецидива) заболевания. Длительность заболевания более 10 лет имела место у 3 больных. У 14 больных был нефротический вариант ХГН, у 18 – смешанный. У 24 больных выполнялась диагностическая нефробиопсия, при этом в 18 случаях имел место мезангиопролиферативный вариант ХГН, в 4 – мембранопротрофиеративный, в 2 – экстракапиллярный гломерулонефрит с полулуниями. У 11 больных на момент включения в исследование была хроническая почечная недостаточность (ХПН): у 8 больных I степени, у 2 – II, у 1 – III. Средняя длительность ХПН составила $3,8 \pm 2,7$ года.

У всех больных оценивали следующие показатели: уровень лейкоцитов, лимфоцитов в периферической крови, скорость оседания эритроцитов, уровень суточной протеинурии, общего белка, альбуминов, общего холестерина, креатинина сыворотки. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1
Динамика лабораторных показателей у больных ХГН на фоне терапии

Показатель	До лечения (n = 32)	Через 1 год (n = 32)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$7,40 \pm 2,96$	$5,20 \pm 3,64$
Лимфоциты, %	$26,47 \pm 10,89$	$25,73 \pm 11,90$
СОЭ, мм/ч	$30,83 \pm 18,61$	$18,35 \pm 9,00^{\wedge}$
СРБ, мг/л	$11,67 \pm 3,61$	$6,50 \pm 2,25^{\wedge}$
Сут. протеинурия, г	$3,84 \pm 3,12$	$1,85 \pm 0,56^{\wedge\wedge}$
Общий белок, г/л	$53,76 \pm 8,55$	$65,75 \pm 10,45^{\wedge}$
Альбумины, г/л	$35,81 \pm 10,84$	$50,21 \pm 9,65^{\wedge}$
Холестерин, ммоль/л	$7,23 \pm 4,35$	$5,80 \pm 1,00^{\wedge\wedge}$
Креатинин, ммоль/л	$207,9 \pm 214,6$	$180,1 \pm 145,2$

Примечание. Достоверность результатов по сравнению с показателем до лечения: $\wedge - p < 0,01$, $\wedge\wedge - p < 0,001$.

Выделение циркулирующих лимфоцитов производилось из гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фиколи-верографина 1,077 и 1,092 г/мл с первоначальным центрифугированием в течение 40 мин при скорости 1500 об/мин с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 400 об/мин в градиенте перколла 1,060 г/мл.

Определение характера повреждений ДНК (1- и 2-нитевые разрывы) проводили по изменению параметров флуоресценции двух ДНК-тропных красителей: бромистого этидия (EtBr) («Sigma», США) и 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) («Serva», США). Аликвоты клеток снимали с лунок микропланшет, однократно отмывали 0,15 М NaCl. Для получения ДНК в виде нуклеоида к полученным пробам добавляли по 20 мкл холодной лизирующей смеси (буфер А: 0,01 М трис-НCl, 0,1 М ЭДТА, 2 М NaCl, 0,5% тритон X-100, pH 8,0) и после перемешивания встряхиванием инкубировали на холоде (2–4 °C) в течение 15 мин. Затем лизаты переносили в буфер Б (0,01 М трис-НCl, 0,1

М NaCl, 0,01 М ЭДТА, рН 7,4) в кювету для измерения флюоресценции. Измерения проводили на приборе ФМ-Ц-2 (ЛФ ВНИИМП, Россия). В кювету с опытной пробой последовательно вносили DAPY (конечная концентрация – 0,1 мкг/мл; параметры интерференционных светофильтров: λ возбуждения – 357, λ эмиссии – 444 нм) и EtBr (конечная концентрация – 4 мкг/мл; параметры интерференционных светофильтров: λ возбуждения – 514, λ эмиссии – 606 нм). Полосы пропускания для DAPY: на возбуждение – 39 и на эмиссию – 15 нм; для EtBr на возбуждение – 26 и на эмиссию – 12 нм. После внесения каждого компонента измеряли флюоресценцию при соответствующих длинах волн возбуждения и эмиссии. Перед внесением красителей определяли фоновую интенсивность флюоресценции при указанных длинах волн. Параллельно определяли аналогичные параметры в пробах, не содержащих лизатов клеток. Находили $\Delta EtBr$ и $\Delta DAPY$, характеризующие изменение флюоресценции красителей при связывании с ДНК по формуле: $\Delta EtBr$ ($\Delta DAPY$) = $I_1 - I_2 - (I_3 - I_4)$, где I_1 – интенсивность флюоресценции пробы, содержащей клеточный лизат и EtBr (DAPY) в буфере Б; I_2 – интенсивность флюоресценции клеточного лизата в буфере Б; I_3 – интенсивность флюоресценции EtBr (DAPY) в буфере Б; I_4 – интенсивность флюоресценции буфера Б. В качестве стандартной ДНК использовали ДНК из эритроцитов цыплят («Reanal», Венгрия), пропущенную 20 раз через иглу с внутренним диаметром 0,3 мм в 0,01 М *tris*-HCl-ЭДТА-буфере, рН 7,4.

Определение активности каспаз проводили с использованием специфических субстратов, меченных флюоресцентной меткой (7-амино-4-трифлюорометилкумарин – AFC) («BioRad», США), детектируемой по изменению флюоресценции или оптической плотности. Клетки (10^6) снимали с лунок микропланшет, дважды отмывали фосфатным буфером, добавляли к клеткам 50 мкл литического буфера, приготовленного смешиванием 920 мкл H_2O , 40 мкл 25х реакционного буфера и 10 мкл каждого из четырех ингибиторов: ФМСФ (фенилметансульфонилфторид) (35 мг/мл), пепстатина А (1 мг/мл), апротинина (1 мг/мл) и лейпептина (1 мг/мл). 25х реакционный буфер включал следующие компоненты: 250 мМ HEPES, рН 7,4, 50 мМ ЭДТА, 2,5% ЧАПС (3-((3-хлорамидопропил)-диметиламмоний)-1-пропансульфонат), 125 мМ дитиотреитола. Далее клетки трижды замораживали в жидком азоте, затем клеточный лизат центрифугировали на микроцентрифуге при 17 000 g (4 °C) в течение 30 мин и брали супернатант (образец). Определение активности каспаз 6 и 8 проводили в реакционном буфере путем смешивания образца и соответствующего специфического субстрата. Субстрат для каспазы 6 – VEID (Val=Glu=Ile=Asp), для каспазы 8 – LETD (Leu=Glu=Thr=Asp). Определение количества отщепленного AFC проводили на СФ = 46 (ЛОМО, Россия) при $\lambda = 395$ нм через 30, 60, 90, 120, 150, 180 мин после начала реакции. Далее строили график изменения активности каспаз в зависимости от времени инкубации образца.

В серии опытов при исследовании активности каспаз 6 и 8 и интенсивности флюоресценции ДНК-тропных красителей в качестве контроля использованы лимфоциты 12 здоровых доноров.

Иммуносупрессивную терапию получали 24 боль-

ных, из них 6 пациентов – терапию преднизолоном в дозе 60 мг/сут в течение 4 недель с последующей постепенной отменой, 8 – циклофосфаном в режиме 1 г в/в или в/м ежемесячно в течение в среднем 12 мес. (средняя суммарная доза составила 10 г), 10 – комбинированную иммуносупрессивную терапию преднизолоном и циклофосфаном в указанных режимах. Иммуносупрессивная терапия прекращалась в случае достижения стойкого положительного эффекта или при появлении или нарастании степени ХПН. Эффективность терапии оценивалась по динамике отечного синдрома, уровня суточной протеинурии, общего белка, альбуминов, холестерина, креатинина сыворотки. Иммуносупрессивная терапия признана эффективной у 16 больных, из них 4 пациента получали терапию преднизолоном, 5 – циклофосфаном и 7 – комбинированную иммуносупрессивную терапию преднизолоном и циклофосфаном.

Все больные обследованы до начала иммуносупрессивной терапии и в динамике через 1 год.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием приложенных Microsoft Excel, SPSS for Windows 10.0, рассчитывались средние показатели, средняя ошибка среднего показателя, коэффициенты корреляции Спирмена.

Результаты

При ХГН нами выявлено повышение активности каспазы 8, инициирующей процесс программированной клеточной гибели, и каспазы 6 (эффекторной каспазы) по сравнению со здоровыми донорами (табл. 2, рис. 1–2). Интенсивность флюоресценции EtBr, специфичного для выявления 2-нитевых разрывов ДНК, при ХГН достоверно не отличается от интенсивности флюоресценции в группе контроля, тогда как интенсивность флюоресценции DAPY, специфичного для выявления 1-нитевых разрывов ДНК, повышена достоверно (табл. 2, рис. 3).

На фоне терапии больных ХГН при положительной динамике суточной протеинурии, уровня общего белка, альбуминов сыворотки, выраженности гиперхолестеринемии и снижении уровня креатинина через год отмечается тенденция к дальнейшей активации каспазы 8 и практически не меняется активность каспазы 6. Интенсивность флюоресценции EtBr не меняется на фоне терапии, интенсивность флюоресценции DAPY снижается и приближается к таковой у группы контроля, однако различия не имеют статистической достоверности (табл. 2, рис. 1–3).

Нами выявлена более высокая активность каспаз 8 и 6 и большее количество 1-нитевых разрывов ДНК у больных с впервые диагностированным ХГН по сравнению с пациентами с обострением ХГН ($p < 0,05$) (табл. 3).

Нами не обнаружено зависимости между клиническим вариантом ХГН и активностью каспаз, количеством разрывов ДНК. Анализ различия активности апоптоза лимфоцитов в зависимости от морфологического варианта не проводился с учетом неравнозначности групп по количеству.

У больных ХГН с наличием ХПН имеет место более низкая активность исследуемых показателей активности апоптоза лимфоцитов по сравнению с группой

Таблица 2
Активность каспаз 8 и 6 и флюоресценции ДНК-тропных красителей при ХГН

Показатель	Контроль	До лечения (n = 32)	Через год (n = 32)	
К 8	30'	0,002 ± 0,0007	0,003 ± 0,0009	0,004 ± 0,0001
	60'	0,005 ± 0,0003	0,005 ± 0,0005	0,006 ± 0,0003
	90'	0,006 ± 0,0001	0,007 ± 0,0008	0,009 ± 0,0002
	120'	0,007 ± 0,0004	0,008 ± 0,0009	0,009 ± 0,0001
	150'	0,009 ± 0,001	0,011 ± 0,0009*	0,013 ± 0,0005*^
	180'	0,010 ± 0,0009	0,015 ± 0,0005*	0,018 ± 0,0005*^
К 6	30'	0,003 ± 0,0001	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0003
	60'	0,006 ± 0,0001	0,005 ± 0,0008	0,005 ± 0,001
	90'	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,0002	0,008 ± 0,0001
	120'	0,008 ± 0,0005	0,008 ± 0,004	0,008 ± 0,0009
	150'	0,009 ± 0,0009	0,010 ± 0,0003	0,012 ± 0,0001*
	180'	0,010 ± 0,001	0,014 ± 0,0001*	0,015 ± 0,0002*^
Фц EtBr	5,3 ± 0,4	5,9 ± 0,6	6,3 ± 0,4	
Фц DAPY	28.1 ± 0.5	32.3 ± 0.3*	34.6 ± 0.3*^	

Примечание. * – p < 0,01 по сравнению с группой контроля, ^ – p < 0,01 при сравнении групп до лечения и на фоне терапии; здесь и далее: Фц – флюоресценция, К 8 и К 6 – каспазы 8 и 6.

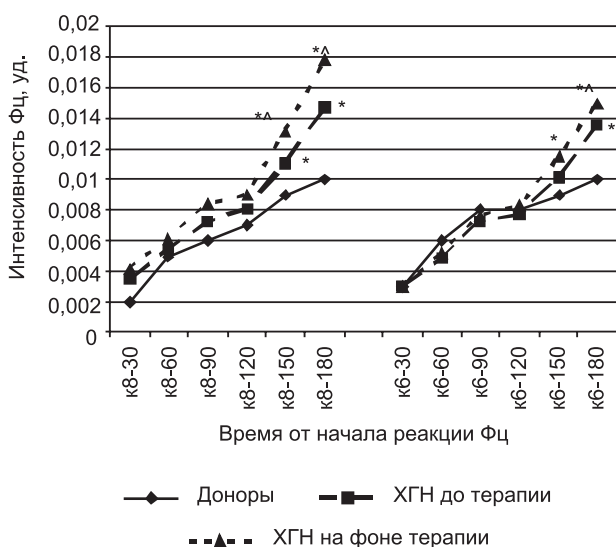


Рис. 1. Активность каспаз 8 и 6 при ХГН в динамике: к8-30 – активность К 8 через 30 мин после начала реакции; к8-60 – активность К 8 через 60 мин после начала реакции; к8-90 – активность К 8 через 90 мин после начала реакции; к8-120 – активность К 8 через 120 мин после начала реакции; к8-150 – активность К 8 через 150 мин после начала реакции; к8-180 – активность К 8 через 180 мин после начала реакции; к6-30 – активность К 6 через 30 мин после начала реакции; к6-60 – активность К 6 через 60 мин после начала реакции; к6-90 – активность К 6 через 90 мин после начала реакции; к6-120 – активность К 6 через 120 мин после начала реакции; к6-150 – активность К 6 через 150 мин после начала реакции; к6-180 – активность К 6 через 180 мин после начала реакции (то же к рис. 3); здесь и далее на рис.: * – достоверность различия по сравнению с показателем в группе контроля p < 0,01; ^ – достоверность различия между группой до лечения и на фоне терапии p < 0,01

больных без ХПН, что отражено в табл. 4.

При изучении корреляции между показателями активности ХГН и показателями активности апоптоза с расчетом коэффициентов Пирсона и Спирмена нами выявлена достоверная отрицательная корреляция между активностью каспазы 8, количеством 1-нитевых разрывов ДНК и выраженностью суточной протеинурии (r = -0,5...-0,7, p < 0,05), гиперхолестеринемии (r = -0,4...-0,7, p < 0,05).

При анализе эффективности иммуносупрессивной терапии через 1 год от исходной активности апоптоза лимфоцитов выявлено, что эффект терапии имел место у больных с исходно более высокой активностью каспаз 8 и 6 и большим количеством 1-нитевых разрывов ДНК (табл. 5, рис. 3–4).

При сравнении динамики активности каспаз 6 и 8 и интенсивности флюоресценции EtBr и DAPY в зависимости от варианта терапии нами обнаружена более выраженная динамика на фоне комбинированной иммуносупрессивной терапии преднизолоном и

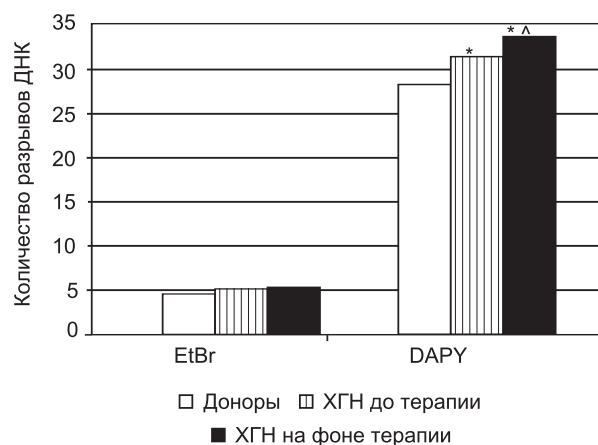


Рис. 2. Активность флюоресценции ДНК-тропных красителей при ХГН в динамике



Рис. 3. Зависимость эффективности иммуносупрессивной терапии через 1 год от ее начала от исходной активности К 8 и К 6

Таблица 3

Активность К 8 и К 6 и флюоресценции ДНК-тропных красителей в зависимости от давности ХГН

Показатель		Дебют ХГН (n = 12)	Обострение ХГН (n = 20)
К 8	30°	0,0032 ± 0,0008	0,0028 ± 0,0001
	60°	0,0055 ± 0,0005	0,0045 ± 0,0003
	90°	0,0075 ± 0,0002	0,0058 ± 0,0007*
	150°	0,012 ± 0,0009	0,0084 ± 0,0004*
	180°	0,015 ± 0,0005	0,085 ± 0,0005**
К 6	30°	0,005 ± 0,0002	0,0045 ± 0,0003
	60°	0,008 ± 0,0008	0,0068 ± 0,0001
	90°	0,0089 ± 0,0009	0,0072 ± 0,0002
	150°	0,011 ± 0,0003	0,009 ± 0,0001*
	180°	0,014 ± 0,0001	0,011 ± 0,0002*
Фц EtBr		6,0 ± 0,5	5,64 ± 0,4
Фц DAPY		34,1 ± 0,9	29,8 ± 0,8*

Примечание. * – p < 0,01 между группами, ** – p < 0,001 между группами.

Таблица 4

Активность К 8 и К 6 и флюоресценции ДНК-тропных красителей в зависимости от наличия ХПН при ХГН

Показатель		ХГН без ХПН (n = 21)	ХГН с ХПН (n = 11)
К 8	30°	0,0033 ± 0,0006	0,0026 ± 0,0001
	60°	0,0055 ± 0,0005	0,004 ± 0,0003
	90°	0,0078 ± 0,0002	0,0055 ± 0,0007
	150°	0,012 ± 0,0011	0,008 ± 0,000*
	180°	0,015 ± 0,0005	0,008 ± 0,0005*
К 6	30°	0,007 ± 0,0003	0,004 ± 0,0003
	60°	0,008 ± 0,0006	0,0065 ± 0,0001
	90°	0,009 ± 0,0008	0,007 ± 0,0002*
	150°	0,009 ± 0,0004	0,0085 ± 0,0001*
	180°	0,010 ± 0,0001	0,011 ± 0,0002*
Фц EtBr		6,1 ± 0,7	5,5 ± 0,5
Фц DAPY		35,3 ± 0,7	29,7 ± 0,3*

Примечание. * – p < 0,01 между группами.

Таблица 5

Зависимость последующей эффективности иммуносупрессивной терапии от исходной активности К 8 и К 6 и флюоресценции ДНК-тропных красителей

Показатель		Терапия эффективна (n = 16)	Терапия неэффективна (n = 8)
К 8	30°	0,0035 ± 0,0005	0,0025 ± 0,0001
	60°	0,0055 ± 0,0006	0,0045 ± 0,0005
	90°	0,008 ± 0,0001	0,0052 ± 0,0008
	150°	0,012 ± 0,0003	0,008 ± 0,000*
	180°	0,014 ± 0,0006	0,078 ± 0,0002*
К 6	30°	0,007 ± 0,0003	0,004 ± 0,0005
	60°	0,008 ± 0,0008	0,0065 ± 0,0003
	90°	0,009 ± 0,0003	0,007 ± 0,0002
	150°	0,012 ± 0,0004	0,008 ± 0,0001*
	180°	0,014 ± 0,0001	0,010 ± 0,0004*
Фц EtBr		6,2 ± 0,5	5,3 ± 0,6
Фц DAPY		36,1 ± 0,7	29,1 ± 0,5^

Примечание. ^ – p < 0,01 между группами, * – p < 0,01 по сравнению с группой контроля.

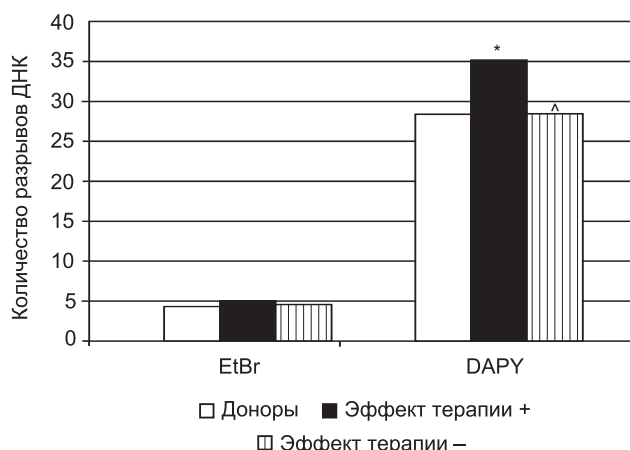


Рис. 4. Зависимость эффективности иммуносупрессивной терапии через 1 год от исходного количества разрывов ДНК

циклофосфаном по сравнению с монотерапией преднизолоном или циклофосфаном, однако полученные результаты не имели статистической достоверности, в связи с чем не представлены.

Обсуждение

Таким образом, по нашим данным, при ХГН до начала терапии имеет место повышение активности программированной клеточной гибели лимфоцитов, оцениваемой по активности каспаз 8 и 6, по сравнению со здоровыми донорами. Возможно, эта активация является результатом возникшего в ответ на развитие болезни дисбаланса про- и противоапоптозных факторов в сторону проапоптозных факторов. В литературе на настоящий момент нам не встретилось описание исследования активности каспаз при ХГН методом флюоресценции, в связи с чем сравнить полученные нами данные с данными других исследователей не представляется возможным. Полученная корреляционная связь между активностью каспаз 6, 8 и показателями активности заболевания (выраженностью суточной протеинурии, гиперхолестеринемии) позволяет говорить о том, что активность каспаз может рассматриваться как дополнительный критерий активности заболевания и эффективности терапии.

Интересным представляется факт выявления высокой частоты 1-нитевых разрывов ДНК при отсутствии существенных различий между больными ХГН и здоровыми донорами по количеству 2-нитевых разрывов ДНК, более характерных для программированной клеточной гибели. Возможно, наличие не 2-нитевых, а 1-нитевых разрывов ДНК позволяет осуществить процессы репарации и избежать фрагментации ДНК и гибели клетки. Необходимо более детальное изучение процессов, происходящих в лимфоцитах и приводящих к развитию именно данного варианта повреждений ДНК.

Более низкая активность апоптоза лимфоцитов у больных при рецидиве ХГН может быть объяснена имеющимися исходными нарушениями активности апоптоза лимфоцитов, что, по сути дела, и могло способствовать развитию обострения патологического

процесса.

Дальнейшее повышение активности каспазы 8 на фоне иммуносупрессивной терапии позволяет говорить о дальнейшей активации начальных процессов апоптоза (индукции эффекторных каспаз), однако этого все-таки недостаточно для достоверной активации эффекторных каспаз (например, каспазы 6) и завершения процесса апоптоза. Возможно, это обусловлено блокирующим действием антиапоптотических факторов. Тот факт, что на фоне иммуносупрессивной терапии не всегда удается достигнуть ремиссии заболевания, особенно учитывая исходно более низкую активность апоптоза лимфоцитов у этой группы больных, может указывать на то, что проблема неэффективности терапии может лежать в недостаточном ее влиянии на нарушенные механизмы программированной клеточной гибели лимфоцитов, а также нацеливать на поиски новых вариантов терапии данного заболевания.

Заключение

В заключение хочется сказать, что мы находимся еще в самом начале пути понимания процесса программированной клеточной гибели, его значения для многих заболеваний, в частности для ХГН, и способности его коррекции. Это задача последующих исследований. Возможно, что уточнение особенностей фармакологического воздействия на процессы апоптоза при острой и хронической почечной патологии позволит в ближайшем будущем повысить эффективность терапии и предотвратить развитие хронической почечной недостаточности, особенно с учетом возрастающих проблем в доступности заместительной почечной терапии.

Литература

1. Астрелина ТА, Оситова ЕЮ, Румянцев СА с соавт. Клиническая оценка чувствительности лейкоэмических клеток к химиотерапии при остром лимфобластном лейкозе у детей по результатам МТТ-теста *ex vivo*. Гематол. и трансфузиол. 2002; 6: 21–25.
2. Багров ЯЮ, Дмитриев НИ. Апоптоз: роль в острой и хронической патологии почек. Нефрология 1998; 2: 18–26.
3. Белушкина НН, Хасан Хамад Али, Северин СЕ. Молекулярные основы апоптоза. Вопросы биол. мед. и фарм. химии 1998; 4: 15–23.
4. Белушкина НН. Роль апоптоза в патогенезе заболеваний. <http://www.science-faculty.net.ru/lek/apoptosis.htm>.

5. Бережков НВ. Апоптоз – управляемая смерть клетки. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1990; 99 (12): 68–75.
6. Владимирская ЕБ. Механизмы апоптотической смерти клеток. Гематол. и трансфузиол. 2002; 47 (2): 35–40.
7. Григорьев МЮ, Имянитов ЕН. Апоптоз в норме и патологии. Медицинский академический журнал 2003; 3 (3): 3–11.
8. Кориунов АМ, Преображенская ИС. Программированная смерть клеток (апоптоз). <http://jabat.narod.ru/005/0172.htm>.
9. Кухта ВК, Морозкина НВ, Богатырева ЕВ. с соавт. Молекулярные механизмы апоптоза. <http://www.msmi.minsk.by/bmm/01.2004/6.html>.
10. Перевезенцева ЮБ. Апоптоз и его роль в патогенезе заболеваний почек. Нефрология 2001; 4: 17–23.
11. Робинсон МВ, Труфакин ВА. Апоптоз клеток иммунной системы. Успехи современной биологии 1991; 111 (2): 246–259.
12. Смирнов ИЕ, Паунова СС. Апоптоз и патологический процесс. <http://www.nczd.ru/art7.htm>.
13. Фильченков АА. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций. Биохимия 2003; 4: 453–466.
14. Цаликова ФД. Апоптоз в патогенезе нефропатий. Нефрология и диализ 1999; 2–3: 127–130.
15. Ярилин АА. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме. Патол. физиол. и экспер. терапия 1998; 2: 38–48.
16. Miller AE, Palmer DH, Hodgkin EA et al. Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs: the role of FADD in activation of caspase-8 and synergy with death receptor ligands in ovarian carcinoma cells. Cell Death and Differentiation 2002; 9: 287–300.
17. Stabke K, Fulda S, Friesen C. et al. Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by *in vivo* chemotherapy. Blood 2001; 98 (10): 3066–3073.
18. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267: 1456–1462.