ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРАНЗИМА Б В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОЧЕК

Кондратенко О.А.¹, Дечко Е.В.¹, Козыро И.А.²

¹ УЗ «10-я городская детская клиническая поликлиника»,

² УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. Хронические заболевания почек широко распространены в популяции, их прогрессирование резко ухудшает качество жизни пациента, в терминальной стадии требуют применения дорогостоящих методов заместительной терапии (диализа или пересадки почки). Своевременная диагностика и лечение позволяют сохранить нормальной почечную функцию в течение долгого времени. Поиск маркеров для неинвазивной диагностики и прогнозирования течения хронической болезни почек представляется актуальным. Целью работы явилось определение уровня маркера апоптоза гранзима Б в сыворотке крови и моче детей с хроническими заболеваниями почек для оценки возможности его использования в диагностике как гломерулярной, так и негломерулярной почечной патологии. Выявлено, что митохондриальный путь запрограммированной гибели клетки является одним из основных звеньев в патогенезе гломерулосклероза. Использование его маркера, гранзима Б, в диагностике позволит повысить качество оказания медицинской помощи детям с хроническими заболеваниями почек.

Ключевые слова: гранзим Б, неиммуноопосредованные гломерулопатии, иммуноопосредованные гломерулопатии, негломерулярные заболевания, апоптоз.

Введение. Апоптоз считается жизненно важным компонентом различных процессов, включая нормальный обмен клеток, правильное развитие и функционирование иммунной системы, эмбриональное развитие и химически индуцированную гибель клеток. Неадекватный апоптоз (либо слишком слабый, либо слишком сильный) является фактором многих заболеваний, включая нейродегенеративные, ишемическое повреждение, аутоиммунные расстройства и др. Апоптоз является гомеостатическим механизмом поддержания клеточных популяций в тканях. Он также возникает как защитный механизм при иммунных реакциях или, например, когда клетки повреждаются патогенными агентами. Хотя существует большое разнообразие стимулов и состояний как физиологических, так и патологических, которые могут вызвать апоптоз, не все клетки обязательно погибнут в ответ на один и тот же стимул. Часть клеток, на которые воздействует триггер, могут быть стимулированы им к делению. Важно отметить, что воспалительной реакции, связанной с процессом апоптоза или с удалением апоптотических клеток, не возникает, поскольку апоптотические клетки не высвобождают свои клеточные компоненты в окружающую интерстициальную ткань, они быстро фагоцитируются окружающими клетками, таким образом, вероятно, предотвращается вторичный некроз, поглощающие клетки не продуцируют противовоспалительные цитокины [1].

При патологическом процессе основной способ защиты организма – избавление от собственных пораженных клеток. Специализированные клетки иммунной системы –

цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры – осуществляют поиск и уничтожение клеток, содержащих чужеродные компоненты: инфицированных, мутировавших или поврежденных. Ликвидация таких клеток осуществляется посредством включения в них программы гибели клеток (апоптоза) и может происходить двумя путями. Первый путь реализуется через взаимодействие лигандов и рецепторов суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF, tumor necrosis factor), например, CD95L (FasL, Fas-лиганд), расположенного трансмембранно на клетках-киллерах, и рецептора CD95 (Fas) на клетках-мишенях. В результате происходит активация каспаз, начиная с каспазы-8, и апоптоз. Вторым путем – это высвобождение содержимого литических гранул клеток-убийц. Чтобы сконцентрировать содержимое литических гранул и обезопасить от него соседние клетки, между клеткой-киллером и клеткой-мишенью формируется иммунный синапс – микроскопическая межклеточная щель, ограниченная плазматическими мембранами взаимодействующих клеток, в которую высвобождаются компоненты литических гранул. В гранулах содержится перфорин с мембраноатакующим комплексом, подобным C5–C9 системы комплемента, создающий каналы в мембране диаметром в среднем ~16 нм. С помощью перфориновых пор внутрь клеток-мишеней проникает еще один компонент гранул – гранзимы – сериновые протеазы, разрезающие внутриклеточные белки-субстраты. Название гранзимы (от словосочетания «гранулярные энзимы») было впервые предложено для двух обнаруженных протеаз – гранзимов А (35 кДа) и В (29 кДа) – в 1986 г. В настоящее время идентифицированы 12 гранзимов, из них пять (А, В, Н, К и М) найдены у человека [2].

Гранзим В – секретируемая иммунная протеаза, участвующая в патогенезе широкого спектра заболеваний человека. Кристаллографические исследования позволили определить общую структуру гранзима В как гомодимера шестицепочечных β-баррелей, организованных вокруг каталитического центра, определяемого триадой: серин, гистидин и аспарагиновая кислота. Субстратная специфичность гранзима В уникальна среди сериновых протеаз. Тетрапептид, расположенный непосредственно на N-конце участка расщепления, неизменно содержит аспарагиновую кислоту. Интересно, что гранзим В активирует каспазы II группы непосредственно путем расщепления их проферментных форм, а также косвенно путем активации расщеплений каспаз III группы, которые, в свою очередь, также расщепляют проферментные формы каспаз II группы. Зрелые каспазы II группы и гранзим В часто расщепляют один и тот же субстрат в участках, расположенных в непосредственной близости (обычно на расстоянии 5–30 аминокислот) или в общих участках [3].

Способность модулировать жизнь или гибель клетки признана за ее огромный терапевтический потенциал. Поэтому исследования по-прежнему сосредоточены на выяснении и анализе механизмов клеточного цикла и сигнальных путей, которые контролируют остановку клеточного цикла и апоптоз.

Цель работы: определить уровень гранзима В в сыворотке крови и моче пациентов с хроническими заболеваниями почек и оценить возможность использования этого маркера в их диагностике.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 128 пациентов педиатрического отделения №1 (для нефрологических больных) Белорусского Центра детской нефрологии и заместительной почечной терапии с хроническими заболеваниями почек в возрасте от 2 до 17 лет. Обследованные дети были распределены по группам: с первичными иммуноопосредованными гломерулопатиями (ГП) (n=30),

с вторичными иммуноопосредованными ГП (n=38), с неиммуноопосредованными ГП (n=30), а также с негломерулярными хроническими заболеваниями почек (n=30), составившие группу сравнения. Все дети с гломерулопатиями имели морфологически подтвержденный диагноз. Критерием включения пациентов в группу сравнения было отсутствие поражения почечных клубочков. В группу контроля вошли 30 детей (пациенты педиатрического отделения №2 (для кардиологических больных) УЗ «2-я городская детская клиническая больница) без признаков поражения почек и наличия аутоиммунного процесса.

Объектом исследования была сыворотка крови и моча пациентов исследуемых групп и группы контроля. Для определения уровня гранзима Б в сыворотке крови производился забор венозной крови с последующим центрифугированием образцов. Полученная сыворотка хранилась в пробирках без использования консерванта при температуре -20°C . Для определения концентрации исследуемого маркера апоптоза в моче забор материала производился из утренней порции, полученной путем естественного мочеиспускания. Образцы также хранились в пробирках без использования консерванта при температуре -20°C . Количественное определение уровня гранзима Б в сыворотке крови и моче производили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем Granzyme B ELISA Kit (E-EL-H1617, Elabscience), Granzyme B (78E96FF66B, Cloud-Clone Corp.). Учет реакции проводили на фотометре универсальном Ф 300 ТП (ОАО Витязь Беларусь), спектрометре Magellan V 7.1, длина волны измерения 450 нм. Результат реакции отображали в пг/мл.

Статистические данные представляли в виде Me (25–75 %), где Me – медиана, (25–75 % – межквартильный размах). Статистическая обработка полученного материала проводилась с применением стандартного пакета «Statistica 10.0» программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. В настоящее время достигнуты значительные успехи в раскрытии патогенетических звеньев прогрессирования хронических заболеваний почек. При этом особое внимание уделяется так называемым неиммунным факторам прогрессирования. Считается доказанным, что неиммунное прогрессирование хронических заболеваний почек развивается вследствие сочетанного воздействия ряда патологических факторов, таких как системная артериальная гипертензия, гемодинамические нарушения в почках, характеризующиеся повышенной перфузией почечных клубочков с развитием внутриклубочковой гипертензии и гиперфльтрации, появление и/или усугубление уже существующей протеинурии, усиление склеротических процессов в почках за счет стимуляции пролиферативных процессов. Все указанные факторы находятся во взаимосвязи и являются звеньями одной патогенетической цепи формирования нефросклероза. При развитии гломерулярного и интерстициального склероза, которые в значительной мере обуславливают прогрессирование хронических заболеваний почек, нарушается баланс между клеточной пролиферацией и гибелью клеток. В основе потери клеточной массы лежит процесс апоптоза. При развитии нефросклероза происходит чрезмерная активация апоптоза гломерулярных и тубулярных эпителиоцитов с потерей в первую очередь таких функционально значимых клеток, как подоциты и тубулярные эпителиоциты [4]. Полученные нами данные свидетельствуют об активном апоптотическом процессе у пациентов с хроническими заболеваниями почек.

У детей с гломерулопатиями выявлено значимое повышение концентрации гранзима Б в сыворотке крови по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). У пациентов с негломерулярными заболеваниями концентрация исследуемого биомаркера также значимо превышала показатели здоровых ($p < 0,001$). Однако его уровень был не настолько высок, как у пациентов с поражением клубочков. Наибольшее значение гранзима Б в моче против группы контроля также отмечалось у детей с гломерулопатиями ($p < 0,001$). И тем не менее уровень маркера апоптоза в моче в группе негломерулярных заболеваний также показал статистически значимые различия по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Концентрация гранзима Б в сыворотке крови и моче

Исследуемая группа	Гранзим Б, сыворотка крови, Ме (25 – 75 %)	Гранзим Б, моча, Ме (25 – 75 %)
Первичные иммуноопосредованные ГП (n=30)	52,3 (10,2 – 62,5)	24,57 (5,93 – 30,5)
Вторичные иммуноопосредованные ГП (n=38)	299,9 (12,1 – 312)	58,3 (4,2 – 62,5)
Неиммуноопосредованные ГП (n=30)	109,25 (0 – 109,25)	62,2 (0,26 – 62,5)
Негломерулярные болезни (n=30)	12,4 (1,6 – 14)	7,68 (5,12 – 12,8)
Группа контроля (n=30)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что во всех исследуемых группах избыточно активирован митохондриальный путь программированной гибели клеток. Особенно это отмечено у пациентов с гломерулярными хроническими заболеваниями почек.

Так как протеинурия является одним из основных факторов прогрессирования хронической болезни почек, а креатинин сыворотки крови – одним из основных ее маркеров, то интересно было проследить корреляцию этих показателей с уровнем гранзима Б в сыворотке крови и моче пациентов исследуемых групп.

В группе первичных иммуноопосредованных гломерулопатий нами прослежено наличие корреляционной связи между креатинином и уровнем гранзима Б в сыворотке крови ($\rho = 0,22$), а также суточной протеинурией ($\rho = 0,03$). Концентрация гранзима Б в моче также коррелировала с креатинином сыворотки ($\rho = 0,1$) и суточной протеинурией ($\rho = 0,05$).

В группе вторичных иммуноопосредованных гломерулопатий связь между концентрацией гранзима Б в сыворотке крови, креатинином ($\rho = -0,24$) и суточной протеинурией ($\rho = -0,04$) оказалась обратной. Прослежена прямая корреляция между концентрацией исследуемого маркера в моче с креатинином сыворотки ($\rho = 0,07$) и суточной протеинурией ($\rho = 0,15$).

У пациентов с неиммуноопосредованными гломерулопатиями удалось установить прямую связь между уровнем гранзима Б в сыворотке крови, креатинином ($\rho = 0,29$) и суточной протеинурией ($\rho = 0,26$). Концентрация гранзима Б в моче показала связь с уровнем белка в суточной моче ($\rho = 0,17$). Прямая связь выявлена между уровнем гранзима Б в моче и креатинином крови ($\rho = 0,4$).

У пациентов с негломерулярными хроническими поражениями почек нами удалось проследить прямую корреляцию между концентрацией гранзима Б в сыворотке крови и суточной протеинурией ($\rho = 0,15$) и концентрацией гранзима Б в моче по отношению к креатинину сыворотки ($\rho = 0,25$). Между концентрацией маркера апоптоза в сыворотке крови по отношению к креатинину ($\rho = -0,3$) также отмечена связь. Прямая сильная корреляция выявлена между значением суточной протеинурии и концентрации гранзима Б в моче ($\rho = 0,51$).

Таким образом, связь уровня гранзима Б с основными факторами прогрессирования хронической болезни почек – протеинурии и креатинина сыворотки, свидетельствует о вовлеченности программированной гибели клетки в механизм нефросклероза.

Заключение. Процессы программированной гибели клеток участвуют в развитии различных форм хронических заболеваний почек. Связь маркера митохондриального пути апоптоза – гранзима Б и основных факторов прогрессирования хронической болезни почек свидетельствует о вовлеченности программированной клеточной гибели в процесс нефросклероза. Статистическая значимость различий концентрации гранзима Б в сыворотке крови и моче пациентов с хроническими заболеваниями почек против показателей здоровых позволяет использовать этот маркер в диагностике как гломерулярной, так и негломерулярной почечной патологии. Также перспективно рассматривать определение гранзима Б в сыворотке крови и моче с точки зрения малой инвазивности исследования.

Литература

1. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 495 – 516.
2. Киселевский, Д.Б. Гранзимы и митохондрии / Д.Б. Киселевский // *Биохимия.* – 2020. – Т. 85. – № 2. – С. 155 – 164.
3. Gapud, E.J., Trejo-Zambrano, M.I., Gomez-Banuelos, E., Tiniakou, E., Antiochos, B., Granville, D. J., Andrade, F., Casciola-Rosen, L., Rosen, A. Granzyme B induces IRF-3 phosphorylation through a perforin-independent proteolysis-dependent signaling cascade without inducing cell death / E.J. Gapud, M.I. Trejo-Zambrano, E. Gomez-Banuelos, E. Tiniakou, B. Antiochos, D. J. Granville, F. Andrade, L. Casciola-Rosen, A. Rosen // *J. Immunol.* – 2021. – Vol. 2. – P. 335 – 344.
4. Комарова, О.В., Кучеренко, А.Г., Смирнов, И.Е., Цыгин, А.Н. Динамика содержания сывороточных маркеров апоптоза для оценки прогноза хронической болезни почек у детей / О.В. Комарова, А.Г. Кучеренко, И.Е. Смирнов, А.Н. Цыгин // *Вопросы современной педиатрии.* – 2013. – Т. 12. – № 5. – С. 104 – 107.

DIAGNOSTIC VALUE OF GRANZYME B DETERMINATION IN BLOOD SERUM AND URINE OF PEDIATRIC PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASES

Kondratenko O.¹, Dechko E.¹, Kazyra I.²

¹ *10th City Children's Clinical Polyclinic,*

² *Belarusian State Medical University,*

Minsk, Republic of Belarus

Chronic kidney diseases are widespread in the population, their progression dramatically worsens the quality of life of the patient, in the terminal stage they require the use of expensive methods of replacement therapy (dialysis or kidney transplantation). Timely diagnosis and treatment make it possible to maintain normal renal function for a long time. The search for markers for noninvasive diagnosis and prediction of the course of chronic

kidney disease seems relevant. The aim of the work was to determine the level of granzyme B apoptosis marker in the blood serum and urine of children with chronic kidney diseases to assess the possibility of its use in the diagnosis of both glomerular and non-glomerular renal pathology. It was revealed that the mitochondrial pathway of programmed cell death is one of the main links in the pathogenesis of glomerulosclerosis. The use of its marker, granzyme B, in diagnostics will improve the quality of medical care for children with chronic kidney diseases.

Keywords: granzyme B, non-immuno-mediated glomerulopathies, immuno-mediated glomerulopathies, non-glomerular diseases, apoptosis.

Поступила 19.10.2023