
Medical sciences
Медицинские науки

УДК 616-092.18

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ КАСПАЗ 3, 6, 9 В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК*

О.Ю. Барышева¹, А.А. Мелентьева², Л.М. Хейфец³, И.Е. Малышева⁴, Л.В. Топчиева⁵, В.А. Илюха⁶

¹доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры госпитальной терапии, ²ординатор отделения гемодиализа, ³кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии, ⁴кандидат биологических наук, научный сотрудник, ⁵кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ⁶доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, зав. лабораторией экологической физиологии животных

^{1,3} Петрозаводский государственный университет

^{4,5,6} Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Республиканская больница им. В.А. Баранова, Россия

Аннотация. Изучение роли апоптоза различных клеток человеческого организма в развитии и прогрессировании нефропатий является одним из актуальных научных направлений. Понимание механизмов регуляции апоптоза позволяет определенным образом воздействовать на его отдельные этапы с целью их регуляции или коррекции. Цель работы – изучить экспрессию мРНК генов каспаз 3, 6 и 9 в лейкоцитах периферической крови больных терминальной стадией хронической болезни почек. Выявлено, что уровень экспрессии мРНК генов каспаз 3, 6 и 9 в лейкоцитах периферической крови больных хронической болезнью почек в терминальной стадии определяют возраст и пол больных.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, апоптоз, лейкоциты, экспрессия мРНК генов каспаз.

Введение.

Апоптоз представляет собой особую, генетически запрограммированную форму гибели клетки и является необходимым условием нормального существования организма. Назначение апоптоза состоит в поддержании постоянства численности клеток, обеспечении правильного соотношения клеток различных типов и удалении генетически дефектных клеток. В последнее время большое внимание уделяется изучению апоптоза с точки зрения влияния его на различные патологические процессы, точнее, можно говорить о нарушениях самого апоптоза как основе ряда заболеваний. Более активное протекание апоптоза способно привести к гибели тканей и органов, тогда как замедление апоптоза – к обратному процессу, неконтролируемому росту и неадекватному функционированию клеток [2-4,8].

Большой интерес представляют данные о значении апоптоза в развитии различного рода нефропатий. Получены данные о том, что при ингибции апоптоза развивается первичный гломерулонефрит, люпус-нефрит, IgA-нефропатия, активация апоптоза играет роль в развитии гломерулосклероза, поликистоза, гидронефроза, интерстициального нефрита, в т. ч. циклоспориновой нефропатии, посттрансплантационной острой почечной недостаточности. Большое значение имеют процессы запрограммированной смерти иммунокомпетентных клеток - гибель Т-лимфоцитов с использованием механизма апоптоза играет большую роль в развитии лимфопении при хронической почечной недостаточности, выявлено положительное влияние активного апоптоза на выживаемость почечного трансплантата у крыс [5,7].

Апоптоз регулируется комплексом биохимических, молекулярных и генетических факторов, большинство из которых полностью не изучено. К наиболее важным регуляторам этого процесса относятся рецепторы гибели клетки, каспазы, митохондрии, семейство Bcl-2 протоонкогенов, отдельные опухоль-подавляющие гены и др. Каспазы представляют собой аспаргат-специфические протеазы, расщепляющие белки в местах расположения аспарагиновых оснований. Эти соединения расположены в цитоплазме в неактивном состоянии для исключения возможности случайной гибели клетки. По своим функциональным обязанностям и структурной гомологии каспазы подразделяются на 3 группы: активаторы цитокинов (каспазы 1, 4, 5, 13); индукторы активации эффекторных каспаз (каспазы 2, 8, 9, 10); эффекторные каспазы - исполнители апоптоза (каспазы 3, 6, 7) [6,11].

Цель настоящего исследования - изучить факторы, влияющие на экспрессию мРНК генов каспаз 3, 6 и 9 в лейкоцитах периферической крови больных хронической болезнью почек в терминальной стадии, получаю-

щих заместительную почечную терапию методом гемодиализа.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 20 больных хронической болезнью почек V стадии (вследствие хронического гломерулонефрита), получающих заместительную почечную терапию методом гемодиализа в отделении гемодиализа ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» (10 мужчин, 10 женщин, средний возраст $60,8 \pm 12,8$ лет) и 20 доноров контрольной группы (14 мужчин, 6 женщин, средний возраст - $47,7 \pm 13,3$).

Выделение тотальной РНК из клеток периферической крови проводили на колонках «Axyuprep Multi-source Total RNA Miniprep Kit» (Axygen), согласно инструкции к набору. Количество и качество выделенной РНК оценивали спектрофотометрически («SmartSpect», Био-Рад). Выделенную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед. а). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора «MMLV RT kit» («Евроген», Москва) согласно инструкции фирмы-производителя. Уровень экспрессии мРНК генов каспаз: 3, 6 и 9 оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler iQ5 (Био-Рад). Для амплификации использовали наборы «qPCRMix-HS SYBR» и праймеры производства фирмы «Евроген» (Москва). В качестве флуорофора для детекции продуктов был использован интеркалирующий краситель SYBR GreenI. Для каждого исследуемого образца реакцию ПЦР-РВ ставили не менее трех раз. Ген *GAPDH* использовали в качестве референсного гена (ген кодирует белок - глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу). Относительный уровень экспрессии (ОУЭ) определяли по формуле:

$ОУЭ = 2^{-\Delta C_t}$, где ΔC_t - разница между значениями пороговых циклов для референсного и таргетного генов.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statgraphics 2.1. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни применяли для сравнения показателей в группе больных и группе контроля.

Результаты исследования.

Полученные результаты представлены в таблице 1. Значимых различий в уровне экспрессии мРНК гена каспазы 3 между исследуемой группой больных хронической болезнью почек и контрольной группой обнаружено не было ($p > 0,05$). В исследуемой группе больных хронической болезнью почек среди женщин наблюдалась тенденция к повышению уровня экспрессии мРНК гена каспазы 3 по сравнению с контролем, среди мужчин – понижение уровня экспрессии.

Таблица 1

Относительный уровень экспрессии мРНК генов каспаз 3, 6 и 9 в лейкоцитарной фракции периферической крови больных ХБП, в терминальной стадии и доноров контрольной группы

Группы	CASP3	CASP6	CASP9
Контроль (n=20)	0,055±0,01	0,006±0,001	0,019±0,002
Мужчины	0,055±0,011	0,003±0,001	0,015±0,003
Женщины	0,055±0,017	0,009±0,002	0,023±0,003
Больные ХБП (n=20) ((n=17)	0,048±0,019	0,011±0,001	0,020±0,002
Мужчины	0,034±0,026	0,008±0,001	0,013±0,003
Женщины	0,062±0,024	0,013±0,001	0,027±0,002

Примечание: достоверные различия отмечены звездочкой *, $p < 0,05$.

Обнаружено достоверное повышение уровня транскриптов гена каспазы 6 у мужчин, больных хронической болезнью почек, по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). У женщин значительных различий в уровне экспрессии мРНК гена каспазы 6 выявлено не было ($p > 0,05$).

Уровень экспрессии мРНК гена каспазы 9 при хронической болезни почек достоверно не отличался от контроля, отмечена тенденция к понижению уровня транскриптов гена каспазы 9 у мужчин с хронической болезнью почек и к повышению уровня транскриптов гена каспазы 9 у женщин с хронической болезнью почек по сравнению с группой контроля ($p > 0,05$).

Анализ корреляционных зависимостей между генами каспаз 3, 6 и 9 показал наличие положительной корреляционной связи между указанными генами как в группе контроля, так и у больных хронической болезнью почек.

При анализе корреляций между уровнем экспрессии мРНК исследуемых генов каспаз с возрастом и полом обследуемых выявлена отрицательная корреляционная зависимость между уровнем экспрессии мРНК гена каспазы 9 и возрастом обследуемых в группе контроля: наблюдается снижение уровня транскриптов гена

каспазы 9 с увеличением возраста, что представлено на рисунке 1.

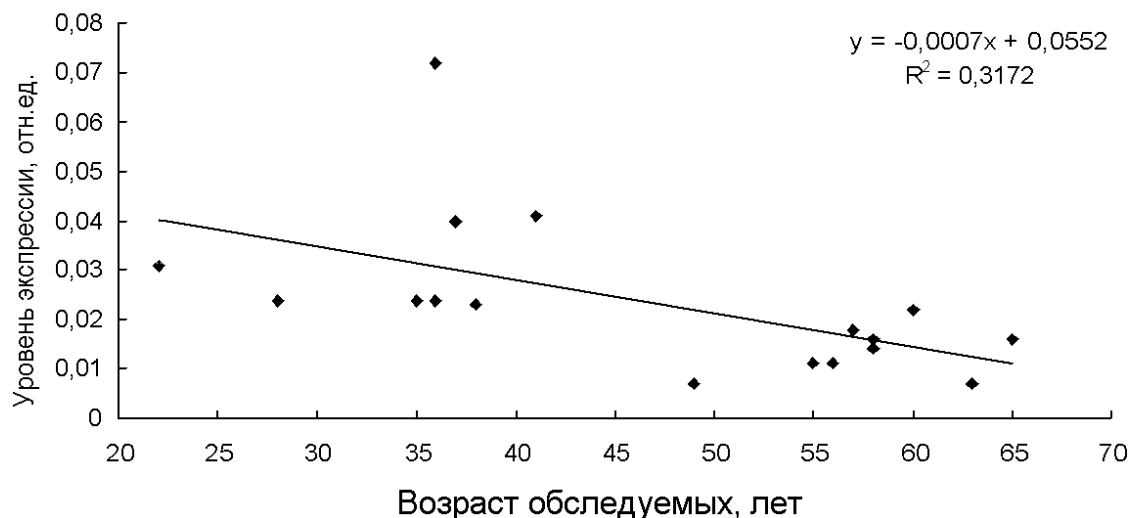


Рис. 1. Зависимость уровня экспрессии мРНК гена каспазы 9 от возраста в контрольной группе

Обсуждение.

Нами не получено достоверных различий в экспрессии мРНК генов каспаз 3, 6 и 9 при хронической болезни почек и у здоровых доноров. Это может быть связано с тем, что больные имели терминальную стадию заболевания, гломерулосклероз, когда иммунологические проявления не так активны, как на более ранних стадиях заболевания. Большое интерес представляет сравнение экспрессии генов каспаз у больных хронической болезнью почек различных стадий, в том числе на этапе сохранной почечной функции. Ранее нами было проведено исследование активности апоптоза лимфоцитов периферической крови больных по активности каспаз 6 и 8 и количеству 1- и 2-нитевых разрывов ДНК, выявившее важную роль активности патологического процесса, а также то, что более высокая активность апоптоза лимфоцитов присуща больным с сохранной функцией органов в сравнении с больными с функциональной недостаточностью, что может косвенно отражать снижение активности патологического процесса у больных с далеко зашедшими стадиями заболеваний и, соответственно, отражать меньшее влияние заболеваний на активность апоптоза [1]. Полученные данные в рамках настоящего исследования подтверждают сделанные ранее выводы.

Также нами получены данные о влиянии пола пациентов на экспрессию мРНК генов каспаз 3, 6 и 9. Полученные результаты можно объяснить тем, что в развитии патологического состояния может играть роль гормональный фон больных, а также разная эпигенетическая регуляция процессов онтогенеза у мужчин и женщин. Утрата В-клетками андрогеновых рецепторов у андроген-нокаутных мышей способна привести к увеличению продукции В-клеток в крови и костном мозге. Результатом В-клеточной экспансии является их устойчивость к апоптозу (через изменение ключевых модуляторов апоптоза: Fas/FasL, каспаз-3/-8, NF-κB, и Bcl-2), а также повышенная пролиферация предшественников этих клеток в костном мозге [9,10].

Важным представляется факт снижения экспрессии мРНК генов каспаз в зависимости от возраста в контрольной группе здоровых людей, что может говорить о снижении активности апоптоза в более старшем возрасте и возникновении риска заболеваний, ассоциированных с угнетенным апоптозом.

Полученные результаты не являются окончательными. Исследование должно быть продолжено для поиска ответов на поставленные вопросы.

**Работа выполнена в рамках Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», при финансовой поддержке гранта правительства РФ №11.G31.34.0052 и государственного задания Минобрнауки России на 2013 год (проект № 4.6221.2011).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышева О.Ю. Оптимизация диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза при иммуновоспалительных заболеваниях (ревматоидном артрите, системной красной волчанке, хроническом гломерулонефрите). Дисс. докт. мед. наук: 14.00.05: защищена 14.04.2009 / Барышева Ольга Юрьевна. – Петрозаводск, 2009. – 343 с.
2. Владимирская, Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток / Е.Б. Владимирская // Гематология и трансфузиология, 2002. – Т. 47. – № 2. – С. 35-40.
3. Григорьев, М.Ю. Апоптоз в норме и патологии / М.Ю. Григорьев с соавт. // Медицинский академический журнал, 2003. – Т. 3. – № 3. – С. 3-11.
4. Кухта, В.К., Морозкина, Н.В., Богатырева, Е.В., Сокольник, И.Г. Молекулярные механизмы апоптоза. – Режим

доступа: <http://www.msmi.minsk.by/bmm/01.2004/6.html> свободный. – Загл. с экрана.

5. Перевезенцева, Ю.Б. Апоптоз и его роль в патогенезе заболеваний почек / Ю. Б. Перевезенцева // Нефрология, 2001. – Т. 5. – № 4. – С. 17-23.
6. Фильченков, А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций / А.А. Фильченков // Биохимия, 2003. – Т. 68. – № 4. – С. 453-466.
7. Цаликова, Ф.Д. Апоптоз в патогенезе нефропатий / Ф. Д. Цаликова // Нефрология и диализ, 1999. – Т. 1. – № 2–3. – С. 1-6.
8. Role of Apoptosis in disease / B. Favaloro et al. // AGING., 2012. – V. 4. – № 5. – P. 330-349.
9. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective / D. Fairweather. et al. // The American Journal of Pathology, 2008. – Vol. 173. – № 3. – P. 600-609.
10. Susceptibility to autoimmunity and B cell resistance to apoptosis in mice lacking androgen receptor in B cells / Saleh Aultwajri et al. // Mol. Endocrinol, 2009. – V. 23. – № 4. – P. 444-453.
11. The biochemistry of apoptosis / M.O. Hengartner // Nature, 2000. – V. 407. – P. 770-776.

Материал поступил в редакцию 28.08.13.

EXPRESSION OF INFORMATIONAL RIZIFORM OF CASPASE GENES 3, 6, 9 IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES AT THE TERMINAL STAGE OF CHRONIC RENAL DISEASE

O.Yu. Barysheva¹, A.A. Melentyeva², L.M. Heifetz³, I.E. Malysheva⁴, L.V. Topchieva⁵, V.A. Ilyukha⁶

¹ Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Professor of Hospital Therapy Department, ² Hospital Physician of Dialysis Department, ³ Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of Hospital Therapy Department,

⁴ Candidate of Biology, Research Scientist, ⁵ Candidate of Biology, Senior Research Scientist,

⁶ Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Senior Research Scientist, laboratory Chief of Ecological Animal Physiology

^{1, 3} Petrozavodsk State University

^{4, 5, 6} Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences

² Republican Hospital named after V.A. Baranov, Russia

Abstract. *The role studying of apoptosis of various cells of human body in development and progressing of nephropathy is one of the actual scientific directions. The understanding of mechanisms of regulation of apoptosis allows to influence its separate stages for the purpose of regulation or correction. The work purpose is to study an expression of informational riziform of caspase genes 3, 6 and 9 in leukocytes of peripheral blood of patients with a terminal stage of chronic renal disease. It is revealed that the level of expression of informational riziform of caspase genes 3, 6 and 9 in leukocytes of peripheral blood of patients with chronic renal disease at terminal stage it is determined age and gender of patients.*

Keywords: *chronic renal disease, apoptosis, leukocytes, expression of informational riziform of caspase genes.*