

УДК 616.61-008.64-085.38.033.1-097

## РОЛЬ УРЕМИЧЕСКОЙ ПЛАЗМЫ В АКТИВАЦИИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ГЕМОДИАЛИЗЕ

<sup>1</sup>Осиков М.В., <sup>1</sup>Агеев Ю.И., <sup>1</sup>Черепанов Д.А., <sup>1</sup>Гизингер О.А.,  
<sup>2</sup>Аклеев А.А., <sup>2</sup>Федосов А.А.

<sup>1</sup>Научно-образовательный центр «Проблемы фундаментальной медицины»;  
<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Челябинск, e-mail: kanc@chelsma.ru, prof.osikov@yandex.ru

Изменение иммунного статуса при ХПН (хронической почечной недостаточности) и, как следствие развитие сердечно-сосудистой, инфекционной патологии, заболеваний воспалительного генеза может быть связано с процессами гибели лимфоцитов путем апоптоза или некроза. Проверка гипотезы выполнена на 14 больных ХПН-пациентах отделения диализа ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». Группа контроля ( $n = 14$ ) представлена клинически здоровыми людьми-добровольцами. Для изучения влияния плазмы больных ХПН на апоптоз интактных лимфоцитов в суспензию лимфоцитов здоровых людей добавляли плазму больных ХПН, после чего инкубировали в условиях термостата при 37°C в течение 30 мин. Апоптоз лимфоцитов оценивали при окрашивании клеток аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5 – FITC/7-AAD kit» («Beckman Coulter», США) на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США) с дифференцировкой интактных клеток (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), клеток с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), клеток с признаками некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+). Установлено, что у больных ХПН, находящихся на гемодиализной терапии, в периферической крови увеличивается количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза на 63%, одновременно поздними признаками апоптоза и признаками некроза – на 640%, признаками некроза – на 383% и, как следствие, снижается количество интактных лимфоцитов на 15% при сравнении с группой здоровых людей. Факторами активации гибели лимфоцитов выступают вещества, находящиеся в плазме крови, т.к. добавление плазмы крови больных ХПН к лимфоцитам здоровых людей приводит к увеличению количества клеток с одновременно поздними признаками апоптоза и признаками некроза и клеток с признаками некроза.

**Ключевые слова:** лимфоциты, апоптоз, хроническая почечная недостаточность

## ROLE OF UREMIC PLASMA INDUCING APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE ON HEMODIALYSIS

<sup>1</sup>Osikov M.V., <sup>1</sup>Ageev Y.I., <sup>1</sup>Cherepanov D.A., <sup>1</sup>Gizinger O.A., <sup>2</sup>Akleev A.A., <sup>2</sup>Fedosov A.A.

<sup>1</sup>Research and Education Center of Basic Medicine Issues;  
<sup>2</sup>State Funded Educational Institution of Higher Professional Education «South Ural State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk,  
e-mail: kanc@chelsma.ru, prof.osikov@yandex.ru

The immune status change in CRF (chronic renal failure) inducing the development of cardiovascular, inflammatory diseases, infections can be related to the processes of lymphocyte death by apoptosis or necrosis. Hypothesis testing was performed on 14 patients with CFR in dialysis unit of Chelyabinsk Regional Hospital. The control group ( $n = 14$ ) presented clinically healthy volunteers. To study the plasma influence of CRF patients on apoptosis of intact lymphocytes, plasma of patients with CFR was added to suspension of lymphocytes from healthy volunteers and incubated in the thermostat at 37°C for 30 min. Apoptosis was assessed by staining of lymphocyte cells by Annexin V (Annexin-5-FITC) and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) from Annexin 5-FITC/7-AAD kit («Beckman Coulter», USA) with Beckman Coulter's Navios Flow Cytometer with the differentiation of intact cells (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), cells with early apoptosis signs (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), cells with advanced apoptotic signs and partially necrotic cells (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), cells with signs of necrosis (Annexin-5-FITC-/7-AAD+). In patients with CRF undergoing hemodialysis lymphocyte count with apoptosis early signs was found to increase by 63% in peripheral blood, simultaneously with apoptosis late signs and necrosis signs by 640%, signs of necrosis – 383% and as a consequence the number of intact lymphocytes was reduced by 15% comparing with that of healthy individuals. Factors of lymphocyte death activation are blood plasma substances because plasma of patients with CRF being added to lymphocytes of healthy individuals increases the number of cells with both late apoptosis signs and signs of necrosis and cells with signs of necrosis.

**Keywords:** lymphocytes, apoptosis, chronic renal failure

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) – клиничко-лабораторный синдром, вызванный необратимой гибелью нефронов и проявляющийся прогрессирующим поражением различных органов и систем, в том числе кроветворения и иммуногенеза. Ранее нами продемонстрированы изменения у больных ХПН в системе гемостаза,

функционального состояния вегетативного и соматического отделов нервной системы, иммунного статуса, процессов свободно-радикального окисления [1–10]. Следует учитывать, что развитие сердечно-сосудистой, инфекционной патологии, заболеваний воспалительного генеза у данной категории больных связано с дисфункцией иммунной системы в связи с изменением количественного состава, функциональной активности и кооперации между полиморфно-ядерными лейкоцитами, моноцитами/макрофагами, другими антигенпрезентирующими клетками и лимфоцитами [11]. В частности, депрессия адаптивного звена иммунитета является ведущим механизмом развития инфекционной патологии, а активация врожденного звена иммунитета и связанная с ней манифестация локального и системного воспаления способствует развитию и прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из механизмов дисфункции иммунного ответа может выступать изменение апоптоза иммунокомпетентных клеток, что, с одной стороны, может способствовать элиминации активированных фагоцитов, с другой – приводить к прогрессированию иммунной недостаточности, т.е. дисбаланс между про- и антиапоптогенными механизмами может занимать ключевую позицию в патогенезе осложнений при ХПН. **Цель работы** – исследовать влияние плазмы крови больных ХПН на выраженность апоптоза лимфоцитов.

#### Материалы и методы исследования

Для реализации поставленной цели использована кровь больных людей с ХПН-пациентов отделения диализа ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». Первоначально обследовано 150 больных с терминальной стадией ХПН в возрасте от 21 до 60 лет, получающих гемодиализную терапию на аппаратах «Искусственная почка» 4008S/BIBAG фирмы Fresenius (Германия) 3 раза в неделю в течение 4 часов. Критерии исключения:

- 1) больные после трансплантации почки;
- 2) наличие на момент исследования гнойно-септических осложнений;
- 3) наличие у больных увеличенных лимфатических узлов любой локализации;
- 4) больные, принимающие глюкокортикостероидную и/или цитостатическую терапию;
- 5) злокачественные и доброкачественные опухоли любой локализации;
- 6) ВИЧ-инфекция, гепатит С, гепатит В;
- 7) аутоиммунные и/или аллергические заболевания. После рандомизации в исследование включено 14 больных.

Кровь для исследований у больных забиралась из артериального колена артериовенозной фистулы до процедуры гемодиализа. Группа контроля ( $n = 14$ ) представлена клинически здоровыми людьми-добровольцами, не имеющими соматической патологии и сопоставимыми по возрасту и полу с основной

группой. Для изучения влияния плазмы больных ХПН на апоптоз интактных лимфоцитов проведен эксперимент в условиях *in vitro*. В суспензию лимфоцитов здоровых людей добавляли аутологичную плазму (контроль) или плазму больных ХПН (опыт), после чего инкубировали в условиях термостата при 37°C в течение 30 мин. Лимфоциты из периферической крови выделяли на двойном градиенте плотности фиколла и урографина, концентрацию лимфоцитов в суспензии доводили до  $3 \cdot 10^6$ /л. Апоптоз лимфоцитов оценивали при окрашивании конъюгированным с флуорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5 – FITC/7-AAD kit» («Beckman Coulter», США) на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США) с дифференцировкой интактных клеток (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), клеток с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), клеток с признаками некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+). Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 8.0. Проверку статистических гипотез проводили с использованием критериев Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца, Вилкоксона.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что у больных ХПН в периферической крови снижается количество лимфоцитов без признаков некроза и апоптоза (Annexin-5-FITC-/7-AAD-) за счет увеличения количества клеток, несущих признаки раннего апоптоза, позднего апоптоза и некроза (табл. 1). Наблюдается увеличение количества лимфоцитов, экстернализирующих на наружной поверхности мембраны фосфатидилсерин (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), на 63%, экстернализирующих фосфатидилсерин и одновременно проницаемых для катионного красителя (Annexin-5-FITC+/7-AAD+) – на 640%, только проницаемых для катионного красителя (Annexin-5-FITC-/7-AAD+) – на 383%. Таким образом, гибель лимфоцитов при ХПН обусловлена процессами апоптоза и некроза клеток. Ранее нами было показано, что у больных с терминальной стадией ХПН снижается количество Т-лимфоцитов и их субпопуляций, В-лимфоцитов, НК-клеток в периферической крови [9]. Снижение количества лимфоцитов в крови приводит к дефициту клеточного и гуморального адаптивного иммунитета, дефектам презентации антигенов иммунокомпетентным клеткам и, как следствие, росту заболеваемости и неблагоприятным исходам различной инфекционной патологии при ХПН.

Другими исследователями показано, что неоднозначные результаты при оценке апоптоза лимфоцитов у больных ХПН связаны с видом заместительной терапии (гемодиализ или перитонеальный диализ),

биосовместимостью мембраны диализатора, скоростью потока диализной жидкости и др. факторами. Установлено, что наличие маркеров апоптоза в Т-лимфоцитах (аннексин V, CD95+, фрагментация ДНК) коррелирует с признаками их ранней активации (CD69+) и усиливается процедурой гемодиализа. С использованием метода измерения длины теломера у больных ХПН установлено преждевременное старение CD8+ Т-лимфоцитов [14]. В-лимфопения у больных терминальной ХПН может быть связана с гибелью клеток путем апоптоза

в связи с пониженной экспрессией Bcl-2, повышенной экспрессией длинной изоформы BLNK (B cell LiNKer protein), которая подавляет активацию митоген-активируемой протеинкиназы p38, JNK, повышает экспрессию c-Fos и активирует BCR-индуцированный апоптоз В-лимфоцитов. При использовании метода ПЦР в реальном времени показано, что у больных ХПН, находящихся на гемодиализе, а также в преддиализной группе по сравнению со здоровыми людьми значительно повышен уровень мРНК длинной изоформы BLNK [13].

Таблица 1

Показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных ХПН (M ± m)

Показатели	Лимфоциты здоровых людей (n = 14)	Лимфоциты больных с ХПН (n = 14)
Интактные клетки, % клеток	80,83 ± 0,83	68,33 ± 2,17 *
Ранний апоптоз, % клеток	19,06 ± 0,82	31,05 ± 2,12 *
Поздний апоптоз, % клеток	0,05 ± 0,01	0,37 ± 0,05 *
Некроз, % клеток	0,06 ± 0,01	0,29 ± 0,04 *

Примечание. \* – статистически значимые (p < 0,05) различия с группой здоровых людей.

Таблица 2

Влияние плазмы больных ХПН на показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови здоровых людей (M ± m)

Показатели	Группа 1 Лимфоциты здоровых людей + плазма здоровых людей (n = 14)	Группа 2 Лимфоциты здоровых людей + плазма больных ХПН (n = 14)
Интактные клетки, % клеток	80,83 ± 0,83	81,51 ± 1,54
Ранний апоптоз, % клеток	19,06 ± 0,82	18,26 ± 1,53
Поздний апоптоз, % клеток	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,02 *
Некроз, % клеток	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,03 *

Примечание. \* – статистически значимые (p < 0,05) различия с группой 1.

На следующем этапе работы нами исследовано влияние уремической плазмы на апоптоз интактных лимфоцитов. Предпосылками для проведения эксперимента явились данные о том, что факторами преждевременной гибели Т- и В-лимфоцитов, дендритных клеток при ХПН выступают азотемия, избыток в крови продуктов перекисидации липидов, паратиреоидного гормона, железа и окисленных липопротеинов низкой плотности [15]. Одним из механизмов Т-лимфоцитопении выступает повышение концентрации в плазме крови у больных ХПН, находящихся на гемодиализе, индоламина-2,3-диоксигеназы (IDO) и аргиназы I типа (ARG), участвующих в катаболизме соответственно триптофана и аргинина. Установлены проапоптотическое и антипролиферативное действие IDO и ARG на Т-клетки, их концентрация в крови обратно пропорциональна абсолютному количеству Т-лимфоцитов у диализных боль-

ных [12]. Кроме того, IDO рассматривают как фермент с иммуномодулирующими свойствами, возможно, участвующий в регуляции выраженности воспалительного процесса, прогрессировании атеросклероза и ИБС при ХПН, уровень IDO в плазме отрицательно коррелирует с концентрацией ИЛ-6 и СРБ.

Нами установлено, что инкубация уремиической плазмы с интактными лимфоцитами приводит к увеличению количества лимфоцитов, экспрессирующих на своей мембране маркеры одновременно позднего апоптоза и некроза (Annexin-5-FITC+/7-AAD+), а также маркеры некроза (Annexin-5-FITC-/7-AAD+) (табл. 2). Количество клеток с признаками раннего апоптоза, а также количество интактных лимфоцитов значимо не изменилось. По данным других исследователей, инкубация изолированных от здоровых доноров лимфоцитов с уремиической плазмой приводила

к снижению количества жизнеспособных и функционально активных клеток, что связывают с эффектами окисленными липопротеинами низкой плотности (OxLDL). В условиях *in vitro* OxLDL дозо-зависимо активируют апоптоз и снижают количество Tregs в связи с повышением уровня в клетках p27Kip1, ингибитора циклин-зависимой киназы, блокирующих клеточный цикл в фазе G1. Кроме того, OxLDL активируют Fas-опосредованный апоптоз CD4+ Т-лимфоцитов в связи со снижением экспрессии рецептора к ИЛ-2.

Таким образом, у больных ХПН, находящихся на гемодиализной терапии, в периферической крови увеличивается количество лимфоцитов с ранними и поздними признаками апоптоза, признаками некроза и, как следствие, снижается количество интактных лимфоцитов. Факторами активации гибели лимфоцитов выступают вещества, находящиеся в плазме крови, т.к. добавление плазмы крови больных ХПН к лимфоцитам здоровых людей приводит к увеличению количества клеток с признаками некроза и апоптоза.

#### Список литературы

1. Осиков М.В. Влияние гемодиализа на процессы свободно-радикального окисления у больных хронической почечной недостаточностью / М.В. Осиков, В.Ю. Ахматов, Л.В. Кривохижина // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2007. – № 16 (71). – С. 95–97.
2. Осиков М.В. Гемостазиологические эффекты альфа-1-кислого гликопротеина при экспериментальном септическом перитоните / М.В. Осиков, Е.В. Макаров, Л.В. Кривохижина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 8. – С. 143–145.
3. Осиков М.В. Влияние альфа-1-кислого гликопротеина на процессы свободнорадикального окисления при экспериментальной печеночной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 7. – С. 29–31.
4. Осиков М.В. Роль оромукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности / М.В. Осиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 7. – С. 27–30.
5. Осиков М.В. Анализ гематологических эффектов эритропоэтина у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на диализе / М.В. Осиков, К.В. Ахматов, Л.В. Кривохижина, В.Ю. Ахматов // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2009. – № 20 (153). – С. 79–82.
6. Осиков М.В. Роль эритропоэтина в коррекции нарушений сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 9–3. – С. 462–466.
7. Осиков М.В. Эфферентные и антиоксидантные свойства эритропоэтина при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, Ю.И. Агеев // Эфферентная терапия. – 2011. – Т. 17, № 4. – С. 7–13.
8. Осиков М.В. Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов / М.В. Осиков, Т.А. Григорьев, А.А. Федосов, Козочкин Д.А., Ильных М.А. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6. – С. 195–195.
9. Осиков М.В. Уровень эритропоэтина и иммунный статус организма у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе / М.В. Осиков, Л.Ф. Телешева, Ю.И. Агеев, А.А. Федосов // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 158.
10. Осиков М.В. Патологические аспекты изменения и коррекции врожденного иммунитета при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, Л.Ф. Телешева,

Ю.И. Агеев, Д.А. Черепанов, А.А. Федосов // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – С. 274.

11. Betjes, M.G. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease / M.G. Betjes // Nat. Rev. Nephrol. – 2013. – Vol. 5. – P. 255–265.
12. Eleftheriadis, T. Plasma indoleamine 2,3-dioxygenase and arginase type I may contribute to decreased blood T-cell count in hemodialysis patients / T. Eleftheriadis, E. Yiannaki, G. Antoniadi et al. // Ren. Fail. – 2012. – Vol. 34(9). – P. 1118–1122.
13. Kim, K.W. B cell-associated immune profiles in patients with end-stage renal disease (ESRD) / K.W. Kim, B.H. Chung, E.J. Jeon et al. // Exp. Mol. Med. – 2012. – Vol. 44(8). – P. 465–472.
14. Meijers R.W. Uremia causes premature ageing of the T cell compartment in end-stage renal disease patients / R.W. Meijers, N.H. Litjens, E.A. de Wit et al. // Immun Ageing. – 2012. – Vol. 9(1). – P. 19.
15. Vaziri, N.D. Effect of uremia on structure and function of immune system / N.D. Vaziri, M.V. Pahl, A. Crum, K. Norris // J. Ren. Nutr. – 2012. – Vol. 1. – P. 149–156.

#### References

1. Osikov M.V., Ahmatov V.Ju., Krivohizhina L.V., Vestnik Juzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Obrazovanie, zdavoohranenie, fizicheskajakul'tura, 2007, vol. 16 (71), pp. 95–97.
2. Osikov M.V., Makarov E.V., Krivohizhina L.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2007, vol. 144, no.8, pp. 143–145.
3. Osikov M.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2007, vol. 144, no.7, pp. 29–31.
4. Osikov M.V. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. – Bulletin of experimental biology and medicine, 2009, vol. 148, no.7, pp. 27–30.
5. Osikov M.V., Ahmatov K.V., Krivohizhina L.V., Ahmatov V.Ju. VestnikJuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. 2009, no. 20 (153), pp. 79–82.
6. Osikov M.V., Grigor'ev T.A. Fundamentalni essledovaniâ – Fundamental research, 2011, no. 9–3, pp. 462–466.
7. Osikov M.V., Grigor'ev T.A., Ageev Ju.I. Jefferentnaja terapija. – Efferent therapy, 2011, vol. 17, no. 4, 7–13.
8. Osikov M.V., Grigor'ev T.A., Fedosov A.A., Kozochkin D.A., Il'nyh M.A. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. – Modern problems of science and education, 2012, vol. 6, pp. 195.
9. Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Ju.I., Fedosov A.A. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. – Modern problems of science and education, 2013, vol. 4, pp. 158.
10. Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Ju.I., Cherepanov D.A., Fedosov A.A. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. – Modern problems of science and education, 2013, vol. 5, pp. 274.
11. Betjes, M.G. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease / M.G. Betjes // Nat. Rev. Nephrol. 2013. Vol. 5. pp. 255–265.
12. Eleftheriadis, T. Plasma indoleamine 2,3-dioxygenase and arginase type I may contribute to decreased blood T-cell count in hemodialysis patients / T. Eleftheriadis, E. Yiannaki, G. Antoniadi et al. // Ren. Fail. 2012. Vol. 34(9). pp. 1118–1122.
13. Kim K.W. B cell-associated immune profiles in patients with end-stage renal disease (ESRD) / K.W. Kim, B.H. Chung, E.J. Jeon et al. // Exp. Mol. Med. 2012. Vol. 44(8). pp. 465–472.
14. Meijers R.W. Uremia causes premature ageing of the T cell compartment in end-stage renal disease patients / R.W. Meijers, N.H. Litjens, E.A. de Wit et al. // Immun Ageing, 2012. Vol. 9(1), pp. 19.
15. Vaziri, N.D. Effect of uremia on structure and function of immune system / N.D. Vaziri, M.V. Pahl, A. Crum, K. Norris // J. Ren. Nutr. 2012. Vol. 1. pp. 149–156.

#### Рецензенты:

Куренков Е.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии человека, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск;

Абрамовских О.С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 04.02.2014.