



## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОЧЕК

О. А. Кондратенко<sup>1</sup>, И. А. Козыро<sup>2</sup>

<sup>1</sup>10-я городская детская клиническая поликлиника, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

**Введение.** Представлены результаты анализа содержания маркеров апоптоза в сыворотке крови и моче у пациентов детского возраста с хроническими заболеваниями почек. Обсуждаются перспективы использования гранзима B и аннексина V в комплексной диагностике хронических нефропатий и оценке их прогрессирования.

**Цель.** Проанализировать возможность использования в комплексной диагностике хронических заболеваний почек определения гранзима B и аннексина V в сыворотке крови и моче у пациентов детского возраста.

**Материал и методы.** Обследованы 100 детей с хроническими гломерулопатиями. В группу сравнения вошли пациенты с хроническими негломерулярными нефропатиями. Количественное определение уровня маркеров апоптоза производили методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Концентрация гранзима B в сыворотке крови значимо различалась между всеми исследуемыми группами ( $N=159$ ,  $p<0,001$ ), равно как и в моче ( $N=158$ ,  $p<0,001$ ). При сравнении содержания аннексина V в сыворотке крови ( $N=136$ ,  $p<0,23$ ) и моче ( $N=138$ ,  $p<0,20$ ) у пациентов всех групп статистически значимых различий не получено. Корреляционных связей между концентрацией аннексина V в сыворотке крови и моче с характеристиками почечных функций (уровень креатинина сыворотки крови, мочевины сыворотки, СКФ) и активности патологического процесса (СРБ, СОЭ, суточная протеинурия) не обнаружено.

**Выводы.** Определение уровня гранзима B в сыворотке крови и моче может быть использовано в диагностике хронических заболеваний почек у детей, в том числе для дифференциальной диагностики гломерулярных и негломерулярных хронических заболеваний почек, а также гломерулопатий между собой. Использование аннексина V, раннего маркера апоптоза, в качестве инструмента диагностики хронических заболеваний почек и мониторинга их прогрессирования на данном этапе исследования не представляется возможным.

**Ключевые слова:** хронические заболевания почек, апоптоз, гранзим B, аннексин-V, нефропатии.

**Для цитирования:** Кондратенко, О. А. Клиническое значение определения маркеров апоптоза в сыворотке крови и моче детей с хроническими заболеваниями почек / О. А. Кондратенко, И. А. Козыро // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2024. Т. 22, № 6. С. 538-543. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-6-538-543>.

### Введение

Хронические заболевания почек широко распространены во всем мире, встречаются более чем у 10% людей, и их число продолжает расти. Ограниченные возможности традиционных маркеров почечной дисфункции, таких как сывороточный креатинин, хорошо продемонстрированы в литературе [1]. Дополнение клинической оценки новыми биомаркерами, в частности, гранзим B (GzmB) и аннексин-V (AnnV), может улучшить диагностику хронических заболеваний почек и мониторинг их течения.

Апоптоз – обусловленный генетически механизм разрушения клеток, когда происходит фрагментация клеточных структур на отдельные апоптотические тельца и дальнейшее поглощение этих телец макрофагами – жизненно важный компонент нормального обмена клеток. Однако неадекватный апоптоз (либо слишком слабый, либо чрезмерный) – один из механизмов многих заболеваний [2,3]. Изменение количества клеток, возникающее в результате дисбаланса между гибелью паренхиматозных клеток и их пролиферацией, способствует развитию заболеваний почек. Острое повреждение почек (ОПП) возникает в результате быстрой и внезапной потери эпителиальных почечных клеток. При хронической болезни почек (ХБП) происходит постепенная,

прогрессирующая потеря подоцитов и эпителиальных клеток канальцев. Гибель эндотелиоцитов вызывает гломерулосклероз и атрофию канальцев, а избыток лейкоцитов и миофибробластов провоцирует интерстициальное воспаление и фиброз. Апоптоз стал центральным событием в патогенезе разных нефропатий [4].

Для исследования апоптоза доступно достаточно большое число биомаркеров, поскольку множество белков участвует в сигнальном каскаде программированной гибели клеток. Раннюю фазу апоптоза можно обнаружить с помощью AnnV, выявляемого при потере целостности клеточной стенки [5]. AnnV принадлежит к семейству цитоплазматических кальций-связывающих белков, обнаруженных в клетках дистальных канальцев и эпителиоцитах клубочков. Изучение содержания AnnV может помочь понять многие патологические процессы в почках. Так, повышенные уровни AnnV обнаружены как при острых, так и при хронических заболеваниях почек [6].

Непосредственный участник апоптоза – гранзимы – сериновые протеазы, разрезающие внутриклеточные белки-субстраты. Идентифицированы 12 гранзимов, из них пять (A, B, H, K и M) найдены у человека [7]. GzmB – фермент, продуцируемый естественными киллерами и CD8+ клетками, депонируется во внутриклеточных

гранулах. GzmB обладает четко выраженной внутриклеточной активностью; после секреции гранул GzmB интернализуется в клетки-мишени с помощью порообразующего белка перфорина, где инициирует апоптоз посредством каспазо-зависимых и независимых механизмов. [8]. Уровень GzmB повышается в сыворотке крови при системной красной волчанке и коррелирует с показателями плохого прогноза при волчаночном нефрите, что позволяет предположить участие GzmB в патогенезе поражения почек и указывает на возможность использования в качестве биомаркера и/или терапевтической мишени [9].

**Цель работы** – проанализировать возможность использования в комплексной диагностике хронических заболеваний почек определения гранзима B и аннексина V в сыворотке крови и моче у пациентов детского возраста.

### Материал и методы

В исследование включены 100 пациентов педиатрического отделения № 1 (для нефрологических пациентов) Белорусского Центра детской нефрологии и заместительной почечной терапии. Медиана возраста (Me) составила 7 (9-16) лет. Пациенты разделены на группы: с первичными иммуноопосредованными гломерулопатиями (ГП) (группа № 1, n=30), с вторичными иммуноопосредованными ГП (№ 2, n=39), с неиммунными ГП (№ 4, n=31), у всех диагнозов верифицирован морфологически. В группу сравнения вошли пациенты с негломерулярными хроническими заболеваниями почек (№ 3, n=30). Группу контроля (№ 5) составили 28 пациентов педиатрического отделения № 2 (для кардиологических пациентов УЗ «2-я ДГКБ») без признаков поражения почек и наличия аутоиммунного процесса. Количественное определение уровня гранзима B в сыворотке крови и моче производили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем Granzyme B (E-EL-H1617, Elabscience), Granzyme B (78E96FF66B, Cloud-Clone), Human GzmB Elisa Kit (EH0157, Fine Test). Определение концентрации аннексина V производили методом ИФА с использованием тест-систем Human ANXA5 Elisa Kit (E-EL-H0422, Elabscience), Human ANXA5 Elisa Kit (EH0423, Fine Test), Human Annexin 5 ELISA Kit (E1107Hu, VT LAB). Учет реакции на фотометре универсальном Ф 300 ТП (ОАО Витязь Беларусь), спектрометре Magellan V 7.1, длина волны измерения 450 нм. С учетом того, что концентрации исследуемых молекул в биологических средах были исключительно малые, а чувствительность использованных наборов разных производителей была разной, оценка производилась в баллах, исходя из нормирования пределов измерений на 10. Статистическая обработка проводилась с применением стандартного пакета Statistica 10.0, программы Microsoft Excel, данные представляли в виде Me (25-75%), где Me – медиана, (25-75% – межквартильный размах).

### Результаты и обсуждение

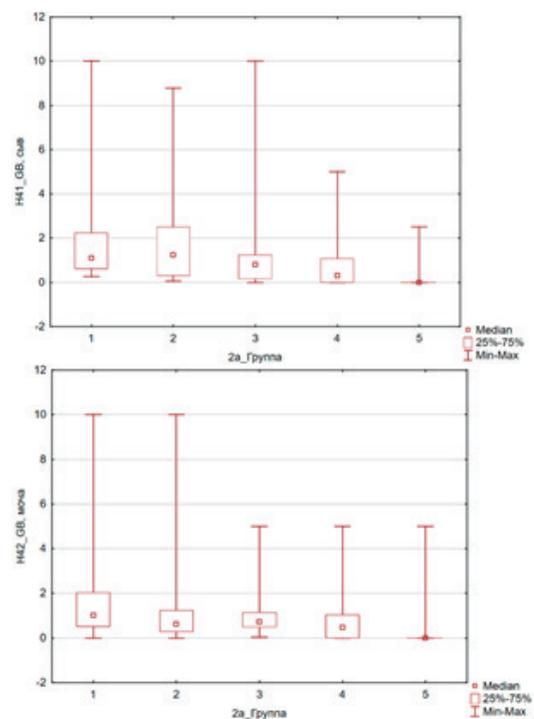
Полученные нами уровни содержания GzmB и AnnV в сыворотке крови и моче у пациентов

исследуемых групп, групп сравнения, контроля представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** – Содержание гранзима B и аннексина-V в сыворотке крови и моче у обследованных  
**Table 1.** – The content of granzyme B and annexin-V in the blood serum and urine of the examined

Исследуемая группа	Гранзим B, Me (25-75%)		Аннексин V, Me (25-75%)	
	сыворотка крови	моча	сыворотка крови	моча
Первичные иммуноопосредованные ГП	1,10 (0,63-2,23) (n=30)	1,02 (0,51-2,03) (n=30)	0,70 (0,24-1,50) (n=30)	1,36 (0,34-2,42) (n=30)
Вторичные иммуноопосредованные ГП	1,25 (0,31-2,50) (n=39)	0,63 (0,29-1,25) (n=39)	0,92 (0,65-1,33) (n=30)	0,68 (0,13-1,36) (n=30)
Неиммуноопосредованные ГП	0,31 (0-1,07) (n=31)	1,48 (0-1,03) (n=31)	0,51 (0,24-0,88) (n=26)	1,06 (0,23-2,72) (n=27)
Негломерулярные заболевания	0,81 (0,16-1,25) (n=31)	0,72 (0,49-1,13) (n=30)	0,63 (0,34-1,24) (n=25)	0,91 (0,04-3,46) (n=26)
Группа контроля	0 (0-0) (n=28)	0 (0-0) (n=28)	0,52 (0-1,44) (n=25)	0,68 (0-1,84) (n=25)

Концентрация GzmB в сыворотке крови у пациентов показала статистически значимые различия среди всех исследуемых групп (N=159, p<0,001). В моче уровень GzmB также значительно различался у пациентов всех групп (N=158, p<0,001), рисунок 1.



**Рисунок 1.** – Концентрация гранзима B в сыворотке крови и моче у обследованных  
**Figure 1.** – Granzyme B concentration in blood serum and urine of the examined patients

Нами проведено сравнение содержания GzmB в сыворотке крови и моче у пациентов исследуемых групп между собой по критерию Манна-Уитни (табл. 2).

**Таблица 2.** – Сравнение содержания гранзима Б в сыворотке крови у обследованных

**Table 2.** – Comparison of granzyme B content in the blood serum of the examined patients

Биологическая среда	Уровень статистической значимости различий, p				
	Группы	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Сыворотка крови	2 группа	0,90			
	3 группа	0,014	0,019		
	4 группа	<0,001	<0,001	0,12	
	5 группа	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Моча	2 группа	0,058			
	3 группа	0,080	0,76		
	4 группа	0,009	0,17	0,10	
	5 группа	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

На основании полученных результатов сделан вывод о том, что определение содержания GzmB в сыворотке крови и моче у пациентов можно применять в комплексной диагностике хронических заболеваний почек, а также использовать для дифференциального разграничения иммуноопосредованных от неиммуноопосредованных ГП и от негломерулярных хронических нефропатий.

Мы провели корреляционный анализ связи содержания GzmB в сыворотке крови и моче у пациентов исследуемых групп с показателями, характеризующими почечную функцию (уровень креатинина сыворотки крови, мочевины сыворотки крови, скорость клубочковой фильтрации (СКФ)), активность патологического процесса (С-реактивный белок (СРБ), скорость оседания эритроцитов (СОЭ), суточная протеинурия). Полученные результаты представлены в таблице 3.

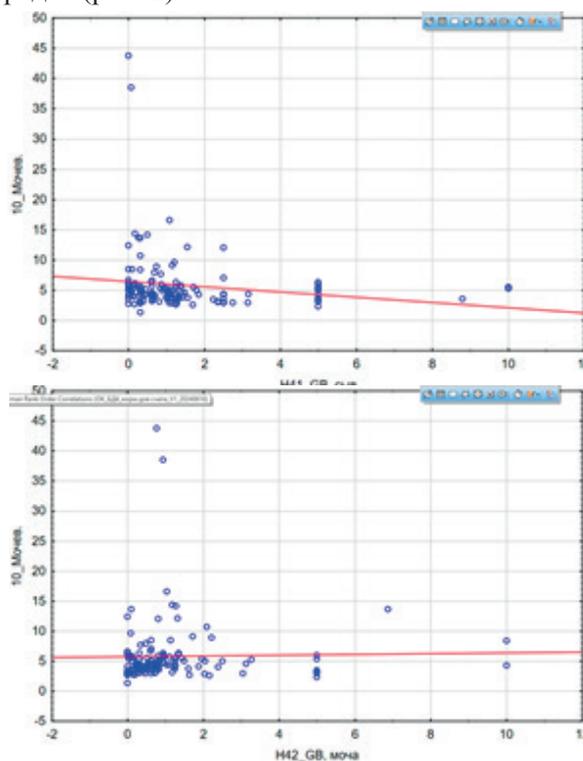
Выявлена прямая корреляционная связь между содержанием GzmB в сыворотке крови и уровнем СРБ, а также обратная связь с концентрацией мочевины. Уровень исследуемого маркера в моче также показал корреляционную

**Таблица 3.** – Корреляционный анализ связи гранзима Б, маркеров активности заболевания и почечной функции

**Table 3.** – Correlation analysis of the relationship of granzyme B, markers of disease activity and renal function

	Коэффициент Спирмана, ρ					
	Креатинин	Мочевина	СРБ	СОЭ	СКФ	Суточная протеинурия
Гранзим Б, сыворотка крови	0,0282	-0,2489	0,3173	0,0313	0,0052	0,0764
Гранзим Б, моча	0,3523	0,1335	0,0871	0,0138	-0,2776	0,1599

связь с показателями, отражающими почечную функцию – уровень креатинина сыворотки и СКФ. Из полученных данных следует, что монотонной регрессионной зависимости между уровнем GzmB в исследуемых биологических средах и маркерами активности патологического процесса, а также показателями, характеризующими функциональное состояние почек, нет. Поэтому для исследования характера возможной связи произведен визуальный анализ рассеяния показателей креатинина, мочевины, СРБ, СКФ, СОЭ, суточной протеинурии в зависимости от уровня GzmB в сыворотке крови и моче. Рассмотрим на примере связи концентрации мочевины в сыворотке крови и GzmB в обеих исследуемых средах (рис. 2).



**Рисунок 2.** – Рассеяние уровня мочевины относительно гранзима Б в сыворотке крови и моче

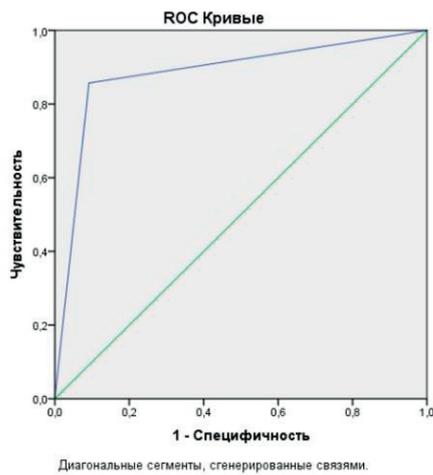
**Figure 2.** – Dispersion of urea levels relative to granzyme B in blood serum and urine

Визуальный анализ показывает, что при содержании GzmB в сыворотке крови меньше 2,6 концентрация мочевины превышает 6,4 ммоль/л, при уровне GzmB меньше 2,2 в моче значение мочевины превышает 6,0 ммоль/л.

Категоризация показателей не привела к обнаружению статистически значимых связей, однако в ряде случаев достигнутый уровень значимости оказался  $p < 0,1$ , что позволяет говорить о тенденции GzmB к корреляции с основными маркерами почечного повреждения.

На основании полученных данных сделан вывод о том, что оценка содержания GzmB в сыворотке крови и моче у пациентов с хроническими заболеваниями почек может быть применима в мультивариантных моделях мониторинга активности патологического процесса, а также его прогрессирования.

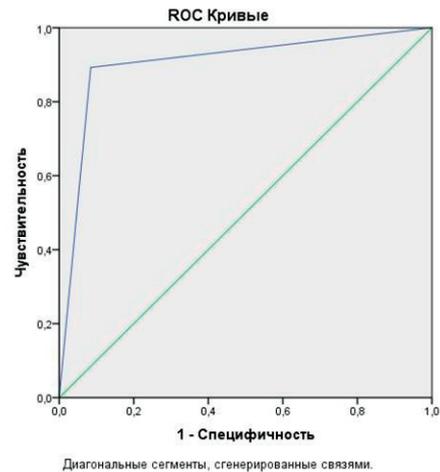
Анализируя содержание GzmB в сыворотке крови, мы определили фактор риска хронических заболеваний почек. Так, при уровне биомаркера  $>0$  отношение шансов (ОШ): 58,8 (95% ДИ 18,5-200). ROC-анализ показал диагностическую точность 88,3% (95% ДИ 80,2-96,3%), чувствительность 85,7%, специфичность 90,8% (рис. 3).



**Рисунок 3.** – Определение риска возникновения заболевания по содержанию гранзима B в сыворотке крови  
**Figure 3.** – Determination of the risk of disease by the content of granzyme B in blood serum

При уровне GzmB  $>0$  в моче отношение шансов 90,2 (95% ДИ 23,4-347), диагностическая точность 90,4% (95% ДИ 83,2-97,6%), чувствительность 89,3%, специфичность 91,5% (рис. 4).

При сравнении содержания AnnV в сыворотке крови (N=136,  $p<0,23$ ) и моче (N=138,  $p<0,20$ ) у пациентов всех групп статистически значимых различий не получено. Корреляционных связей между концентрацией исследуемого маркера с характеристиками почечной функции (уровень креатинина сыворотки крови, мочевины сыворотки, СКФ) и активности патологического



**Рисунок 4.** – Определение риска возникновения заболевания по содержанию гранзима B в моче  
**Figure 4.** – Determination of the risk of disease by the content of granzyme B in urine

процесса (СРБ, СОЭ, суточная протеинурия) не обнаружено.

### Заключение

Апоптоз играет значительную роль в развитии разных форм хронических заболеваний почек. Связь маркера митохондриального пути апоптоза – гранзима B и основных показателей, характеризующих почечные функции, свидетельствует о вовлеченности запрограммированной клеточной гибели в процесс нефросклероза. Определение уровня гранзима B в сыворотке крови и моче может быть использовано в диагностике хронических заболеваний почек у детей, в том числе для дифференциальной диагностики гломерулярных и негломерулярных хронических заболеваний почек, а также гломерулопатий между собой. Оценка содержания гранзима B в сыворотке крови и моче у пациентов с хроническими заболеваниями почек может быть применима в мультивариантных моделях мониторинга активности патологического процесса, а также его прогрессирования.

Использование аннексина V, раннего маркера апоптоза, в качестве инструмента диагностики хронических заболеваний почек и мониторинга их прогрессирования на данном этапе исследования не представляется возможным.

## Литература

1. Benoit, S. W. Cystatin C as a biomarker of chronic kidney disease: latest developments / S. W. Benoit, E. A. Ciccia, P. Devarajan // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2020. – Vol. 20, № 10. – P. 1019-1026. – doi: 10.1080/14737159.2020.1768849.
2. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 486-541. – doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
3. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 495-516. – doi: 10.1080/01926230701320337.
4. Regulated cell death pathways in kidney disease / A. B. Sanz, M. D. Sanchez-Niño, A. M. Ramos, A. Ortiz // *Nat Rev Nephrol.* – 2023. – Vol. 19, № 5. – P. 281-299. – doi: 10.1038/s41581-023-00694-0.
5. Alshiraihi, I. Apoptosis Detection Assays / I. Alshiraihi, T. A. Kato // *Methods Mol Biol.* – 2023. – № 2519. – P. 53-63. – doi: 10.1007/978-1-0716-2433-3\_6.
6. Jakubowska, A. Importance of annexin V in kidney diseases / A. Jakubowska, K. Kiliś-Pstrusińska // *Postepy Hig Med Dosw.* – 2015. – № 69. – P. 153-157.
7. Киселевский, Д. Б. Гранзимы и митохондрии / Д. Б. Киселевский // *Биохимия (Москва).* – 2020. – Т. 85, № 2. – С. 155-164. – doi: 10.31857/S0320972520020013. – edn: CNOKZY.
8. Gleave, A. Granzyme B in Autoimmune Skin Disease / A. Gleave, D. J. Granville // *Biomolecules.* – 2023. – Vol. 13, № 2. – P. 388-396. – doi: 10.3390/biom13020388.
9. Systemic and local granzyme B levels are associated with disease activity, kidney damage and interferon signature in systemic lupus erythematosus / H. Kok, L. L. van den Hoogen, J. A. G. van Roon [et al.] // *Rheumatology.* – 2017. – Vol. 56, № 12. – P. 2129-2134. – doi: 10.1093/rheumatology/kex332.
1. Benoit SW, Ciccia EA, Devarajan P. Cystatin C as a biomarker of chronic kidney disease: latest developments. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(10):1019-1026. doi: 10.1080/14737159.2020.1768849.
2. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
3. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
4. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Ortiz A. Regulated cell death pathways in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2023;19(5):281-299. doi: 10.1038/s41581-023-00694-0.
5. Alshiraihi I, Kato TA. Apoptosis Detection Assays. *Methods Mol Biol.* 2023;2519:53-63. doi: 10.1007/978-1-0716-2433-3\_6.
6. Jakubowska A, Kiliś-Pstrusińska K. Znaczenie aneksyny V w chorobach nerek [Importance of annexin V in kidney diseases]. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015;69:153-157. (Polish).
7. Kiselevsky DB. Granzymes and mitochondria. *Biokhimiya* [Biochemistry (Moscow)]. 2020;85(2):155-164. doi: 10.31857/S0320972520020013. edn: CNOKZY. (Russian)
8. Gleave A, Granville DJ. Granzyme B in Autoimmune Skin Disease. *Biomolecules.* 2023;13(2):388-396. doi: 10.3390/biom13020388
9. Kok HM, van den Hoogen LL, van Roon JAG, Adriaansen EJM, Fritsch-Stork RDE, Nguyen TQ, Goldschmeding R, Radstake TRDJ, Bovenschen N. Systemic and local granzyme B levels are associated with disease activity, kidney damage and interferon signature in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (Oxford). 2017;56(12):2129-2134. doi: 10.1093/rheumatology/kex332.

## References

1. Benoit SW, Ciccia EA, Devarajan P. Cystatin C as a biomarker of chronic kidney disease: latest developments.

## THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETERMINING MARKERS OF APOPTOSIS IN BLOOD SERUM AND URINE OF CHILDREN WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

O. A. Kandratsenka<sup>1</sup>, I. A. Kazyra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>City Children's Clinical Polyclinic No. 10, Minsk, Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

*Background.* The results of the analysis of the content of apoptosis markers in the blood serum and urine of pediatric patients with chronic kidney diseases are presented. The prospects of using granzyme B and annexin V in the complex diagnosis of chronic nephropathies and assessment of their progression are discussed.

*Objective.* To analyze the prospects of determining granzyme B and annexin V levels in blood serum and urine of pediatric patients for the complex diagnosis of chronic kidney diseases.

*Material and methods.* We examined 100 children with chronic glomerulopathies. The comparison group included patients with chronic non-glomerular nephropathies. Quantitative determination of the level of apoptosis markers was performed by enzyme immunoassay.

*Results.* The concentration of granzyme B in blood serum ( $N=159$ ,  $p<0.001$ ) as well as in urine ( $N=158$ ,  $p<0.001$ ) significantly differed between all the studied groups. Comparison of the content of annexin V in serum ( $N=136$ ,  $p<0.23$ ) and urine ( $N=138$ ,  $p<0.20$ ) of patients from all groups showed no statistically significant differences. There were no correlations between the concentration of annexin V in blood serum and urine and the characteristics of renal functions (serum creatinine, serum urea, GFR) and the activity of the pathological process (CRP, ESR, daily proteinuria).

*Conclusions. Determining of granzyme B levels in blood serum and urine can be used in the diagnosis of chronic kidney diseases in children, including the differential diagnosis of glomerular and non-glomerular chronic kidney diseases, as well as glomerulopathies among themselves. The use of annexin V, an early marker of apoptosis, as a tool for diagnosing chronic kidney diseases and monitoring their progression is not possible at this stage of the study.*

**Keywords:** *chronic kidney disease, apoptosis, granzyme B, annexin V, nephropathies.*

**For citation:** *Kandratsenka OA, Kazyra IA. The clinical significance of determining markers of apoptosis in blood serum and urine of children with chronic kidney disease. Journal of the Grodno State Medical University. 2024;22(6):538-543. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-6-538-543>.*

---

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

**Об авторах / About the authors**

\*Кондратенко Оксана Александровна / Kandratsenka Oksana, e-mail: kondratencko2011@yandex.ru

Козыро Инна Александровна / Kazyra Inna, ORCID: 0000-0001-8915-445X

\* – автор, ответственный за переписку / *corresponding author*

---

*Поступила / Received: 17.07.2024*

*Принята к публикации / Accepted for publication: 26.11.2024*