

УДК 616.61:616.379-008.64-092:616.155.34:546.172.6-03

Т.Д. Щербань

ДУ «Інститут терапії імені Л.Т. Малої АМН України», м. Харків

АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗ І АГРЕГАЦІЯ НЕЙТРОФІЛІВ У ХВОРИХ НА ДІАБЕТИЧНУ НЕФРОПАТІЮ

Досліджували особливості функціонального стану нейтрофілів хворих на діабетичну нефропатію (ДН). Показано, що агрегаційні властивості нейтрофілів у хворих на ДН підвищуються. Розвиток ДН супроводжувався порушенням функціонування системи NO-синтаз (NOS) у нейтрофілах – зниженням активності конститутивних NOS і підвищенням активності індукцибельної NOS. Використання комплексної терапії із застосуванням тівортину приводило до зниження агрегаційних властивостей нейтрофілів і активації системи NOS за рахунок зростання активності конститутивних NOS.

Ключові слова: діабетична нефропатія, нейтрофіли, агрегація, тівортин.

Основні фактори прогресування діабетичної нефропатії (ДН) – гіперглікемія, дисліпідемія, протеїнурія й порушення антиоксидантного захисту, впливають на морфофункціональний стан нирок і судин як безпосередньо, так і через лейкоцити крові, зокрема нейтрофіли [1, 2]. Нейтрофільна інфільтрація має принципове значення і на початкових стадіях ураження нирок, і на стадіях розвитку й прогресування склерозу. Нейтрофіли реалізують свої численні ефекти, вивільняючи комплекс різних агентів, які в певних умовах можуть приймати участь у захисних реакціях і в той же час ушкоджувати тканину нирки й порушувати її нормальну діяльність [3, 4]. Одним з таких агентів є оксид азоту (NO). У свою чергу, NO бере активну участь у регуляції процесів інфільтрації, активації й диференціації самих нейтрофілів у гломерулах [5, 6].

Роль і нейтрофілів, і NO при ДН досить суперечлива. Нейтрофіли, виконуючи захисні функції, можуть бути джерелом токсичних продуктів, таких як радикали кисню й лізосомальні ферменти, й медіаторів запалення, зокрема NO [5, 7]. Надлишок продукції NO може пошкоджувати клітини нирок, а блокада або недостатність синтезу NO призводить до посилення запальних процесів і прогресування захворювання [8–10]. Посилення синтезу NO в нейтрофільних клітинах у нормі має позитивне значення, оскільки в цьому випадку він діє як один з

основних ефекторів клітинного імунітету. NO синтезується з L-аргініну при участі NO-синтази (NOS), ферменту, що має три основні ізоформи: дві конститутивні (cNOS) – нейрональну (nNOS) і ендотеліальну (eNOS) – і одну індукцибельну (iNOS). Саме з iNOS пов'язують цитотоксичну й патолофізіологічну дію NO [5, 6].

Функціональний стан нейтрофілів і продукція ними NO у хворих на ДН вивчені недостатньо. Крім того, актуальним є пошук препаратів, здатних регулювати як NO-залежні механізми активації нейтрофілів, так і синтез NO цими клітинами. Одним з таких препаратів є Тівортин (L-аргініну гідрохлорид), сполука, що має виражені антиоксидантні властивості.

Метою роботи стало вивчення агрегаційних властивостей нейтрофілів і активності нейтрофільних NO-синтаз у хворих на ДН у динаміці лікування з використанням антиоксидантного препарату Тівортин.

Матеріал і методи. Було обстежено 60 хворих на ДН (48 хворих без порушення азотовидільної функції нирок і 12 хворих із протеїнурією), середній вік пацієнтів – (49 ± 7) років. Контрольну групу склали 14 практично здорових осіб відповідного віку. Функцію нирок оцінювали з урахуванням швидкості клубочкової фільтрації, яку обчислювали за формулою Кокрофта. Всі хворі отримували базову гіпотензивну терапію з використанням інгібітора АПФ (периндоприл у дозі 4 мг один раз на добу) в

© Т.Д. Щербань, 2011

комбінації з антагоністом кальцієвих каналів (амлодипін у дозі від 5 до 10 мг на добу), також лікування проводилось антагоністом рецепторів до ангіотензину II лосартаном у дозі від 25 до 50 мг на добу.

Разом з базовою терапією протягом двох тижнів хворі приймали внутрішньовенно крапельно тівортін («Юрія-Фарм», Україна), що містить 4,2 г L-аргініну гідрохлориду, з подальшим переходом на амбулаторний пероральний прийом протягом 6 тижнів тівортину аспартату по 5 мл (1,0 г препарату) 3 рази на добу.

Нейтрофіли виділяли з периферичної крові хворих і здорових осіб методом двоступінчастого центрифугування [11]. У дослідженні використовували суспензію нейтрофілів, що містила не менше 90 % живих клітин. Життєздатність клітин визначали шляхом забарвлення 0,1% -вим розчином трипанового синього. Нейтрофіли ($1 \cdot 10^6$ клітин/мл) інкубували в середовищі 199 («Пан-Эко», Росія) з 10% -вим вмістом телячої ембріональної сироватки («Пан-Эко», Росія). Агрегацію нейтрофілів визначали за зміною світлової трансмісії з використанням індуктора агрегації пептиду FMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), Sigma (США) [11]. Активність NOS у нейтрофілах досліджували за кількістю нітрит-аніону, який визначали в колориметричній реакції методом Гріна з використанням реактиву Грісса. Для визначення активності iNOS замість CaCl_2 в інкубаційну суміш додавали EDTA. Активність eNOS розраховували як різницю між активностями загальної NOS і iNOS [9].

Отримані дані статистично обробили з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Зміна адгезивних характеристик є, очевидно, найбільш чутливою реакцією нейтрофілів як на вплив патогенних факторів, так і на застосування ліків. Переміщення нейтрофілів з периферичної крові в тканину нирки обумовлено їх захисною функцією, але разом з тим є важливим чинником розвитку ураження нирок [1, 4]. На жаль, більшість досліджень, що підтверджують активну участь нейтрофілів у патогенезі ураження нирок, виконано на експериментальних моделях нефритів, динаміка й механізми розвитку яких значно відрізняються від розвитку нефропатії у хворих на цукровий діабет (ЦД) [12]. У даному дослідженні адгезивну здатність нейтрофілів оцінювали, визначаючи агрегацію клітин у відповідь на стандартний активатор FMLP (рис. 1). У по-

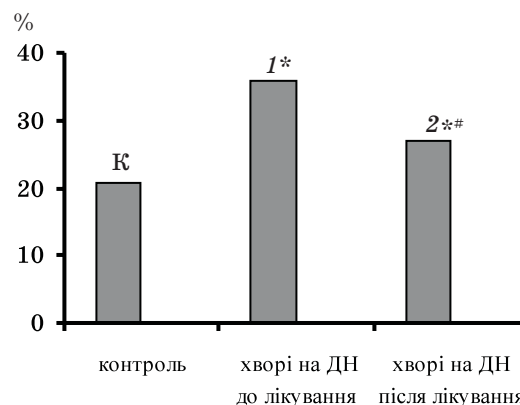


Рис. 1. Рівень агрегації нейтрофілів у хворих на діабетичну нефропатію до лікування (1) і після лікування (2), К – контроль. $p < 0,05$; *вірогідно у порівнянні з контролем; # у порівнянні з групою хворих до лікування

рівнянні з контролем у хворих на ДН відмічається достовірне підвищення кількості агрегованих нейтрофілів.

Не викликає сумніву той факт, що ключову роль у запуску й підтримці властивих ДН патологічних проявів грає підвищений рівень глюкози крові. Неферментативне глікозування білків, аутоокиснення глюкози, що призводить до підвищення рівня агресивних вільних радикалів, безпосередня глікозотоксичність запускають каскад реакцій з боку імунної, фібринолітичної та інших систем [1, 13]. При ДН патогенетичні функції нейтрофілів можуть також стимулюватися протеїнурією й уремією [1, 14]. Аналіз літературних даних показує, що зростання агрегаційних властивостей нейтрофілів у хворих на ДН відбувається внаслідок зміни функціонування рецепторного апарату цих клітин. Виявлені порушення, очевидно, є наслідком змін метаболізму нейтрофілів і структурно-функціональних перебудов їх мембран [7].

Посилення агрегаційної здатності нейтрофілів у хворих на ДН може бути пов'язано з розвитком оксидантного стресу й активацією системи цитокінів і адгезивних молекул. Останні викликають посилення взаємодії клітин різного типу, що сприяє їх локальному накопиченню, розвитку стазу й тромбозу в судинах і може призводити до поліорганичних порушень. При обстеженні хворих на ЦД і зіставленні клінічної картини з даними лабораторних досліджень встановлено підвищення рівня молекул адгезії нейтрофілів до появи перших ознак нефропатії [14, 15]. Показано, що адгезія нейтрофілів активується при утворенні супероксидів і може пригнічуватися NO [4, 7]. Це

обумовлює використання тівортину для корекції агрегаційних властивостей нейтрофілів. Як показали результати нашого дослідження, лікування хворих на ДН із застосуванням тівортину привело до незначного, але достовірного зниження агрегаційної здатності нейтрофілів (рис. 1).

Як відомо, активність NOS і рівень NO можуть істотно зростати в гостру стадію захворювання [5, 8]. Дані про значення цих агентів в умовах хронічної патології найчастіше неоднорідні й досить суперечливі. Аналіз результатів нашого дослідження, виконаного на нейтрофілах хворих на ДН, виявив істотне зниження активності NOS у цих клітинах порівняно з контрольною групою (рис. 2). Зокрема, загальна активність NOS склала $(35,7 \pm 3,7)$ пмоль/мг білка у хв у хворих на ДН і $(85,6 \pm 9,1)$ пмоль/мг білка у хв у контрольній групі. Можна припустити, що хронізація патологічного процесу в нирках призводить до виснаження системи NOS.

пмоль/мг білка/хв

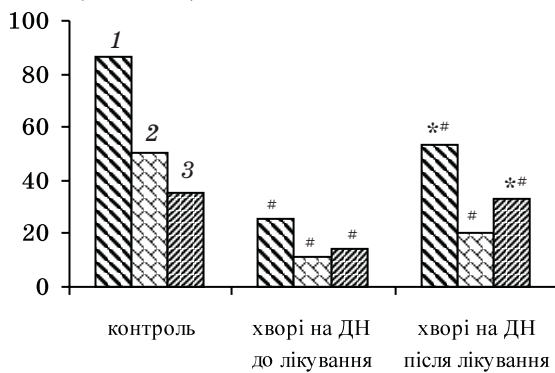


Рис. 2. Активність NO-синтаз в нейтрофілах хворих на ДН:

1 – загальна NOS; 2 – iNOS; 3 – cNOS (достовірність та сама, що і на рис. 1)

Слід зазначити, що, як правило, при патологічних станах активність різних ізоформ NOS змінюється не односпрямовано, а самі зміни не завжди приводять до однозначних наслідків. Так, nNOS і eNOS залучені в процеси ниркової гемодинаміки, а їх дисфункція може викликати інтрагломерулярну гіпертонію [5, 8]. У той же час iNOS синтезується лише після стимуляції медіаторами запалення і є потужним модулятором його прогресування. Показано, що висока тубулоінтерстиційна експресія iNOS у хворих з патологією нирок прямо співвідноситься зі ступенем лімфогістіоцитарної інфільтрації стромы й ураження каналців, а також з рівнем продукції цитокінів у цих тканинах [5]. При цьому активність eNOS

при гломерулонефритах зворотно корелювала зі ступенем ушкодження клубочків. Слід зазначити, що активність eNOS у клубочках нирок хворих з нефритами зменшується, а інгібітор iNOS L-NG-аргінинметил-ефір знижує вміст NO в тканинах нирки й сечі, але не пригнічує активність cNOS, а іноді навіть її підсилює [5].

Як показали результати даного дослідження, використання комплексної терапії на тлі недостовірного зменшення активності iNOS приводило до підвищення активності як загальної NOS, так і cNOS. Отже, визначене нами підвищення активності загальної NOS під впливом терапії з використанням тівортину може відбуватися в основному завдяки зростаючій активності cNOS (рис. 2), інакше кажучи, має місце перерозподіл активностей у системі NOS зі зрушенням у бік cNOS.

Очевидно, ефект тівортину в першу чергу обумовлюється його антиоксидантними властивостями, оскільки серед численних факторів, які порушують функціонування системи NOS, принципове значення має запалення й оксидантний стрес, що виникає внаслідок нього.

Таким чином, у хворих на ДН змінюються агрегаційні властивості нейтрофілів і порушується функціонування системи NOS, що певною мірою обумовлює пошкоджувальну дію цих клітин. Як відомо, гломерулярні ураження, обумовлені акумуляцією нейтрофілів у клубочку, розвиваються переважно в результаті їх дегрануляції й вивільнення протеолітичних ферментів і вільних кисневих радикалів, що приводить до інактивації NO. Крім того, наведені дані вказують на доцільність використання в комплексному лікуванні хворих на ДН препаратів, що містять аргінін, зокрема тівортін.

Висновки

1. У хворих на діабетичну нефропатію змінюється функціональний стан нейтрофілів, зокрема підвищуються їх агрегаційні властивості.

2. Розвиток діабетичної нефропатії супроводжується порушенням функціонування системи NOS у нейтрофілах – зниженням активності cNOS і підвищенням активності iNOS.

3. Використання комплексної терапії із застосуванням тівортину приводило до зниження агрегаційних властивостей нейтрофілів і активації системи NOS внаслідок зростання активності cNOS.

Список літератури

1. *Giunti S.* Mechanisms of diabetic nephropathy / S. Giunti, D. Barit, M. E. Cooper // *Hypertension*. – 2006. – Vol. 48. – P. 519.
2. *Goldberg R. B.* Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications / R. B. Goldberg // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 94 (9). – P. 3171–3182.
3. *Fardon N. J. M.* Abnormalities in primary granule exocytosis in neutrophils from type I diabetic patients with nephropathy / N. J. M. Fardon, R. Wilkinson, H. Th. Trevor // *Clin. Science*. – 2002. – Vol. 102. – P. 69–75.
4. *Sampson M. J.* Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients / M. J. Sampson, I. R. Davies, J. C. Brown // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – Vol. 1, № 22 (7). – P. 1187–1193.
5. *Shelton J. L.* Inducible NO synthase (iNOS) in human neutrophils but not pulmonary microvascular endothelial cells (PMVEC) mediates septic protein leak in vitro / J. L. Shelton, L. Wang, G. Cepinskas // *Microvasc. Res.* – 2007. – Vol. 74, № 1. – P. 23–31.
6. *Patel J. D.* iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils / J. D. Patel, T. Krupka, J. M. Anderson // *J. Biomed. Mater. Res A*. – 2007. – Vol. 80, № 2. – P. 381–390.
7. *Jablonski J.* The influence of human neutrophils on N-nitrosodimethylamine (NDMA) synthesis / J. Jablonski, E. Jablonska, J. Iwanowska // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* – 2006. – Vol. 28, № 1. – P. 93–102.
8. Inhibitory effect of *Panax notoginseng* on nitric oxide synthase, cyclo-oxygenase-2 and neutrophil functions / U. H. Jin, S. G. Park, S. J. Suh [et al.] // *Phytother. Res.* – 2007. – Vol. 21, № 2. – P. 142–148.
9. *Selter M.* Wide spread tissue distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent NO-synthase / R. G. Knowles, S. Moncada // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 291, № 1. – P. 145–149.
10. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
11. *Дуглас С. Д.* Исследование фагоцитоза в клинической практике; пер. с англ. / С. Д. Дуглас, П. Г. Куи. – М.: Медицина, 1983. – 112 с.
12. *Шулутко Б. И.* Нефропатии как сосудистая патология / Б. И. Шулутко // *Нефрология*. – 2003. – № 7 (4). – С. 21–28.
13. *Курумова К. О.* Факторы фиброза, эндотелиальной дисфункции и гемостаза у больных сахарным диабетом и хронической болезнью почек / К. О. Курумова // *Международ. эндокринолог. журн.* – 2010. – № 8 (32). – С. 82–90.
14. *Sokur A.* Adhesion molecules in type 2 diabetes / A. Sokur // *Przegl Lek.* – 2005. – № 62 (4). – P. 234–237.
15. *Mastej K.* Neutrophil surface expression of adhesion molecule CD11b in patients with type 2 diabetes / K. Mastej, R. Adamiec // *Przegl Lek.* – 2009. – № 66 (5). – P. 228–232.

Т.Д. Щербань**АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗ И АГРЕГАЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИЕЙ**

Исследовали особенности функционального состояния нейтрофилов больных диабетической нефропатией (ДН). Показано, что агрегационные свойства нейтрофилов у больных ДН повышаются. Развитие ДН сопровождается нарушением функционирования системы NO-синтаз (NOS) в нейтрофилах – снижением активности конститутивных NOS и повышением активности индуцибельной NOS. Использование комплексной терапии с применением тивортин приводило к снижению агрегационных свойств нейтрофилов и активации системы NOS за счёт возрастания активности конститутивных NOS.

Ключевые слова: диабетическая нефропатия, нейтрофилы, агрегация, тивортин.

T.D. Scherban**ACTIVITY OF NITRIC OXIDE SYNTHASE AND AGGREGATION OF NEUTROPHILS AT PATIENTS WITH DIABETIC NEPHROPATHY**

Particularities of functional state of neutrophils in patients with diabetic nephropathy (DN) were examined. Have been defined the activity of nitric oxide synthase (NOS) in neutrophils and their aggregation. The development DN was accompanied with the breach of the system NOS in neutrophils – a reduction of constitutive NOS activity and increasing of inducible NOS activity. Complex treatment with using tivortin brought about reduction aggregation properties of neutrophils and activation NOS system to account increasing constitutive NOS activity.

Key words: diabetic nephropathy, neutrophils, nitric oxide synthase, aggregation, tivortin.

Поступила 26.05.11