

---

© Топчий И.И., Щербань Т.Д., Оксененко С.В., 2009

УДК: 616.61 - 036.12 - 092 - 085: 546.172.6 - 03: 616.155.34

**И.И. ТОПЧИЙ, Т.Д. ЩЕРБАНЬ, С.В. ОКСЕНЕНКО**  
*I.I. TOPCHIY, T.D. SCHERBAN, S.V. OKSENENKO*

**АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗ И АГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ  
У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ**  
*ACTIVITY OF NITRIC OXIDE SYNTASE, FUNCTIONAL PROPERTIES OF NEUTROPHILS AT PATIENTS  
WITH CHRONIC KIDNEY'S DISEASE UNDER TREAT INFLUENCE*

ГУ "Институт терапии им. Л.Т.Малой АМН Украины", г. Харьков, Украина

**Ключевые слова:** хроническая болезнь почек, нейтрофилы, активность NO-синтаз, агрегация, аргинин-Zn.

**Резюме.** Исследовали особенности функционального состояния 38 больных хронической болезнью почек (ХБП). Было показано повышение агрегационных свойств нейтрофилов у больных ХБП. Развитие ХБП сопровождается нарушением функционирования системы NO-синтаз (NOS) в нейтрофилах - снижением активности конститутивных NOS и повышением ак-

**Топчий И.И**

тивності индуцибельной NOS. Использование комплексной терапии с применением аргинин-Zn приводило к снижению агрегационных свойств нейтрофилов и активации системы NOS за счет возрастающей активности конститутивных NOS.

**Summary.** Particularities of functional state of neutrophils in 38 patients with chronic kidney's diseases (CKD) were examined. Have been defined the activity of nitric oxide synthase (NOS) in neutrophils and their aggregation. Our results showed in patients with CKD aggregative properties of neutrophils were increased. The development CKD 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 arginine-Zn brought about reduction aggregation properties of neutrophils and activation NOS system to account increasing constitutive NOS activity.

Важная роль нейтрофилов в патофизиологических процессах, протекающих при развитии и прогрессировании хронической болезни почек (ХБП), не подвергается сомнению [2, 3]. Нейтрофильная инфильтрация имеет принципиальное значение, как на начальных стадиях поражения почек, так и на стадиях развития и прогрессирования склероза. Нейтрофилы реализуют свои многочисленные эффекты, высвобождая комплекс различных агентов, которые в определенных условиях могут как оказывать защитные воздействия, так и повреждать ткань почки и нарушать ее нормальную деятельность. Одним из таких агентов является оксид азота (NO), который принимает активное участие в регуляции процессов инфильтрации, активации и дифференциации самих нейтрофилов в гломерулах [7, 10].

Роль нейтрофилов и NO при ХБП достаточно противоречива. Нейтрофилы, выполняя свои защитные функции, могут являться источником токсичных продуктов, таких как радикалы кислорода и лизосомальные ферменты, и медиаторов воспаления, в частности NO [8]. Избыток продукции NO может оказывать на клетки почек повреждающее действие, а блокада или недостаточность синтеза NO приводят к усилению воспалительных процессов и прогрессированию заболевания [6, 10]. Усиление синтеза NO в нейтрофильных клетках в норме имеет положительное значение, поскольку в этом случае он действует как один из основных эффекторов клеточного иммунитета. NO синтезируется из L-аргинина при участии NO-синтазы (NOS), фермента, который имеет три основные изоформы: две конститутивные (сNOS) - нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS) и одна индуцибельная (iNOS). Именно с iNOS связывают цитотоксическое и патофизиологическое действие NO.

Как уже отмечалось выше, функциональное состояние нейтрофилов и продукция ими NO у больных ХБП изучены недостаточно. Кроме того, актуальным является поиск препаратов, способных регулировать как NO-зависимые механизмы активации

нейтрофилов, так и синтез NO этими клетками. Последние исследования свидетельствуют, что одним из таких препаратов является аргинин-Zn [2], соединение, обладающее выраженными антиоксидантными свойствами.

Целью нашей работы явилось изучение агрегационных свойств нейтрофилов и активности NO-синтазы в этих клетках у больных ХБП в динамике лечения с использованием антиоксидантного препарата аргинин-Zn.

**Материалы и методы исследования.** Было обследовано 38 больных ХБП (28 больных хроническим пиелонефритом и 10 больных хроническим гломеруло-нефритом). Средний возраст пациентов - (36 7) лет. Контрольную группу составили 14 практически здоровых лиц соответствующего возраста. Диагноз и стадию ХБП устанавливали на основе проведения комплекса клинико-лабораторных, биохимических, бактериологических, ультразвуковых и рентгенологических исследований.

Исходные средние значения систолического артериального давления составили (180 16) мм рт.ст., диастолического - (98 12) мм рт.ст.

Функцию почек оценивали с учетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ), которую вычисляли по формуле Кокрофта.

Все больные получали базовую гипотензивную терапию с использованием ингибитора АПФ (периндоприл в дозе 4 мг один раз в сутки) в комбинации с антагонистом кальциевых каналов (амлодипин в дозе от 5 до 10 мг на сутки), также лечение проводилось антагонистом рецепторов к ангиотензину II (лосартаном в дозе от 25 до 50 мг на сутки).

Вместе с базовой терапией в течение 2 месяцев 2 раза в сутки больные принимали аргинин-Zn (фирма Paragon, США), содержащий 500 мг L-аргинина и 4 мг глицината цинка.

Нейтрофилы выделяли из периферической крови больных и здоровых лиц по общепринятому методу [1]. В исследовании использовали суспензию нейтрофилов, содержащую не менее 90% живых клеток. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окрашивания 0,1% раствором трипанового синего. Нейтрофилы (1x10<sup>6</sup> клеток/мл) инкубировали в среде 199 ("ПанЭко", Россия) с 10% содержанием телячьей эмбриональной сыворотки ("ПанЭко", Россия).

Адгезию нейтрофилов определяли по изменению световой трансмиссии с использованием индуктора агрегации формилового пептида FMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), ("Sigma", США) [1].

Активность NOS в нейтрофилах исследовали по количеству нитрит-аниона, который определяли в колориметрической реакции методом Грина с использованием реактива Грисса. Для определения активности iNOS вместо CaCl<sub>2</sub> в инкубационную смесь вводили EDTA. Активность сNOS рассчитывали как разницу между активностями общей NOS и iNOS [9].

Полученные данные статистически обрабатывались параметрическим методом с применением t-критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Изменение адгезивных характеристик является, по-видимому, наиболее чувствительной реакцией нейтрофилов как на воздействие патогенных факторов, так и на применение лекарств. Перемещение нейтрофилов из периферической крови в ткань почки обусловлено их защитной функцией, но вместе с тем является важным фактором развития поражения почечной ткани. К сожалению, большинство исследований, подтверждающих активное участие нейтрофилов в патогенезе поражения почек, выполнено на экспериментальных моделях нефритов, динамика и механизмы развития которых значительно отличаются от развития ХБП у человека [2, 6]. В настоящем исследовании адгезивную способность нейтрофилов оценивали, определяя агрегацию клеток в ответ на стандартный активатор FMLP. Результаты исследования представлены на рис. 1.

По сравнению с контролем, у больных ХБП отмечено достоверное повышение количества агрегированных нейтрофилов. Усиление агрегационной способности нейтрофилов у больных с ХБП может быть связано с развитием оксидантного стресса и активацией системы цитокинов и адгезивных молекул. В частности показано, что адгезия нейтрофилов активируется при образовании супероксидов и может угнетаться оксидом азота [4, 5]. Последнее обуславливает использование Zn в комплексе с L-аргинином для коррекции агрегационных свойств нейтрофилов. Как показали результаты нашего исследования, лечение больных ХБП с применением аргинин-Zn приводило к незначительному, но достоверному снижению агрегационной способности нейтрофилов.

Как известно, активность NOS и уровень NO могут существенно возрасти на острой стадии заболевания [3, 5]. Данные о значениях этих агентов в условиях хронической патологии зачастую неоднозначны и достаточно противоречивы. Анализ результатов нашего исследования, выполненного на нейтрофилах больных ХБП, выявил существенное снижение активности NOS в этих клетках, по сравнению с контрольной группой (рис. 2). В частности, общая активность NOS составила  $25,7 \pm 3,8$  при ХБП и  $86,7 \pm 9,4$  пмоль/мг белка/мин в контрольной группе ( $p < 0,001$ ). Можно предположить, что хронизация патологического процесса в почках приводит к истощению системы NOS.

Следует отметить, что, как правило, при патологических состояниях активность различных изоформ NOS изменяется не однонаправленно, а сами изменения не всегда приводят к однозначным последствиям. Так, nNOS и eNOS вовлечены в процессы почечной гемодинамики, а их дисфункция может вызывать интрагломерулярную гипертензию [3, 4]. В то же время, iNOS синтезируется лишь после стимуля-

ции медиаторами воспаления и является мощным модулятором его прогрессирования. Показано, что высокая тубулоинтерстициальная экспрессия iNOS у больных нефритами прямо соотносится со степенью лимфогистиоцитарной инфильтрации стромы и поражения канальцев, а также с уровнем продукции цитокинов в этих тканях [10]. В то же время, активность eNOS при гломерулонефритах обратно коррелировала со степенью повреждения клубочков. Следует отметить, что активность eNOS в клубочках почек больных нефритами уменьшается, а ингибитор iNOS L-NG-аргининметилэфир снижает содержание NO в тканях почки и моче, но не угнетает активность cNOS, а иногда даже ее усиливает.

Как показали результаты нашего исследования, использование комплексной терапии на фоне достоверного уменьшения активности iNOS приводило к повышению активности как общей NOS, так и cNOS. Таким образом, определяемое нами повышение активности общей NOS под влиянием терапии с использованием аргинин-Zn, может происходить в основном за счет возрастающей активности cNOS (рис. 2), другими словами, происходит перераспределение активностей в системе NOS со сдвигом в сторону cNOS.

По-видимому, эффект аргинин-Zn в первую очередь обусловлен его антиоксидантными свойствами, поскольку среди многочисленных факторов, нарушающих функционирование системы NOS, принципиальное значение принадлежит воспалению и возникающему вследствие него оксидантному стрессу. Механизм такого эффекта, возможно, обусловлен взаимоопотенцирующим действием веществ, составляющих основу препарата, L-аргинина (предшественник NO) и цинка (кофермент супероксидсмутазы).

Таким образом, у больных ХБП изменяются агрегационные свойства нейтрофилов и нарушается функционирование системы NOS, что в какой-то мере обуславливает повреждающее действие этих клеток при этой патологии. Как известно, гломерулярные поражения, обусловленные аккумуляцией нейтрофилов в клубочке, развиваются преимущественно в результате их дегрануляции и высвобождения протеолитических ферментов и свободных кислородных радикалов, что приводит к инактивации NO.

Кроме того, представленные данные указывают на целесообразность использования в комплексном лечении больных ХБП препаратов, содержащих аргинин, в частности аргинин-Zn.

## ВЫВОДЫ

1. У больных ХБП изменяется функциональное состояние нейтрофилов, в частности повышаются их агрегационные свойства.
2. Развитие ХБП сопровождается нарушением функционирования системы NOS в нейтрофилах -

снижением активности cNOS и повышением активности iNOS.

3. Использование комплексной терапии с применением аргинин-Zn приводило к снижению агрегационных свойств нейтрофилов и активации системы NOS за счет возрастающей активности cNOS.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Дуглас С. Д. Исследование фагоцитоза в клинической практике / С. Д. Дуглас, П. Г. Куи // пер. с англ.- М. : Медицина. - 1983. - 112 с.

2. Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков, И. А. Бондарь, Н. Ф. Круговых, В. А. Труфакин // Москва, "Слово". - 2006. - 556 с.

3. Шулуток Б. И. Нефропатии как сосудистая патология / Б. И. Шулуток // Нефрология. - 2003. - 7 (4). - С. 21-28.

4. Ohse T. Modulation of interferon-induced genes by lipoxin analogue in anti-glomerular basement membrane nephritis / T. Ohse, T. Ota, N. Kieran [et al.] // J Am Soc Nephrol. - 2004. - Vol. 15, № 4. - P. 919-927.

5. Jablonski J. The influence of human neutrophils on N-nitrosodimethylamine (NDMA) synthesis / J.

Jablonski, E. Jablonska, J. Iwanowska, M. Marcinczyk, J. Moniuszko-Jakoniuk // Immunopharmacol Immunotoxicol. - 2006. - Vol. 28. - № 1. - P. 93-102.

6. Jin U. H. Inhibitory effect of Panax notoginseng on nitric oxide synthase, cyclo-oxygenase-2 and neutrophil functions / U. H. Jin, S. G. Park, S. J. Suh, J. K. Kim, D. S. Kim, S. K. Moon, Y.C. Lee, W. H. Park, C. H. Kim // Phytother Res. - 2007. - Vol. 21. - № 2. - P. 142-148.

7. 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. - 80, № 2. - P. 381-390.

8. Schrijver G. Anti-GBN nephritis in the mouse: role of granulocytes in the heterologous phase / G. Schrijver, J. J. Bogman, K. J. Assmann [et al.] // Kidney Int. - 1990. - Vol. 38. - P. 86-95.

9. Selter M. Wide spread tissue distription and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent NO-synthase / M. Selter, R. G. Knowles, S. Moncada // FEBS Lett. - 1991. - 291, № 1. - P. 145-149.

10. 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, M. Sandig, R. Inculet, S. Mehta // Microvasc Res. - 2007. - Vol. 74. - № 1. - P. 23-31.



Рис.1. Уровень агрегации нейтрофилов у больных ХБП

#- достоверность относительно контроля, P<0,05.

\* - достоверность относительно группы больных до лечения, P?0,05.

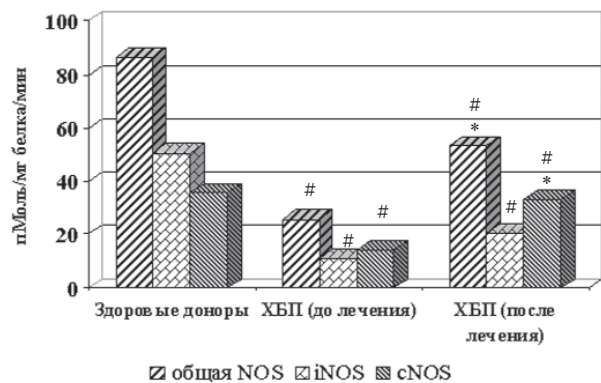


Рис. 2. Активность NO-синтаз в нейтрофилах у больных ХБП.

# - достоверность относительно контроля P<0,05.

\* - достоверность относительно группы больных до лечения, P≤0,05.