

© Топчій І.І., Якименко Ю.С., Семенових П.С., Гальчінська В.Ю., Єфімова Н.В., 2015

УДК: 616.61:616.379-008.64-085

І.І. ТОПЧІЙ, Ю.С. ЯКИМЕНКО, П.С. СЕМЕНОВИХ, В.Ю. ГАЛЬЧІНСЬКА, Н.В. ЄФІМОВА
МЕХАНІЗМИ НЕФРОПРОТЕКТОРНОГО ВПЛИВУ АКТОВЕГІНУ У ХВОРИХ
НА ДІАБЕТИЧНУ НЕФРОПАТІЮ

I.I.TOPCHII, Y.Y.YAKYMENKO, P.S.SEMENOVYKH, V.YU.GALCHINSKAYA, N.V.YEFIMOVA
NEFROPROTECTIVE EFFECTS OF ACTOVEGIN IN PATIENTS WITH DIABETIC NEPHROPATHY

ДУ «Національний інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України», м. Харків

SI «National Institute of Therapy named after L. Malaya of NAMS of Ukraine», Kharkov

Ключові слова: діабетична нефропатія, апоптоз, актовегін.

Key words: diabetic nephropathy, apoptosis, actovegin.

Резюме. Апоптоз, запрограммованная гибель клеток, рассматривается как один из основных механизмов гломерулосклероза при диабетической нефропатии (ДН).

Цель исследования: изучение влияния комбинированной терапии с использованием актовегина на апоптоз лейкоцитов при ДН.

Материалы и методы: Было обследовано 80 больных сахарным диабетом 2 типа с ДН I-IV стадии и 10 здоровых доноров. Количество CD95+-клеток оценивали непрямым иммуногистохимическим методом.

Результаты: количество CD95+-лейкоцитов в периферической крови больных ДН было достоверно выше, чем у здоровых доноров. Дополнительное назначение актовегина в комплексном лечении ДН сопровождалось значительным снижением исследуемого показателя по сравнению с базовой терапией.

Summary. Apoptosis, programmed cell death, regarded as one of the main mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy (DN).

The aim of the present research- to study the effects of actovegin on cell apoptosis in patients with DN.

Materials and methods: we examined 80 type 2 diabetic patients with DN I-IV stages and 10 healthy subjects. CD95+cells number was evaluated by indirect immunohis-

Топчій Іван Іванович
itorchii@yandex.ua

tochemistry. Results: CD95+ -cells number in the peripheral blood of patients with DN was significantly higher than in healthy donors. The additional actovegin treatment was accompanied by a significant decrease of the investigated parameter when compared with the base therapy.

ВСТУП. Цукровий діабет (ЦД) є однією з актуальних проблем сучасної світової медицини. У 2011 році в світі було зареєстровано 275 млн хворих на ЦД 2 типу, проте кількість осіб, які страждають на це захворювання, з кожним роком продовжує стрімко збільшуватися і, за прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я, до 2025 року досягне 350 млн чоловік [4,15].

Однією з основних причин інвалідизації і смертності хворих на ЦД є діабетична нефропатія (ДН) - специфічне мікросудинне ураження як клубочків нирок, так і тубуло-інтерстиціальної тканини, що призводить до розвитку термінальної ниркової недостатності [11].

В багатьох клінічних та експериментальних дослідженнях встановлено, що колаген продукуюча активність міофібробластів, та різке зниження кількості капілярів у хворих на діабет корелює з прогресуванням діабетичного гломерулосклерозу і є невід'ємною ознакою порушення ниркової функції [14]. Як причину втрати ниркових клітин при ДН автори розглядають апоптоз, вид запрограмованої загибелі клітин, зв'язаної з активацією каспаз, що приводить до розпаду білкових субстратів і фрагментації ДНК [16]. Під час відсутності хвороби кількість зрілих лімфоцитів у периферичній крові залишається постійною. Як тільки нові лімфоцити продукуються шляхом мітозу, відповідна кількість лімфоцитів гине внаслідок апоптозу. Інгібіторами чи індукторами апоптозу можуть бути різні ростові фактори, які здатні посилювати проліферацію клітин, або індукувати апоптоз, створюючи тим самим певну симптоматику захворювання [5]. Порушення контролю клітинної загибелі веде до зрушень гомеостазу і розвитку різних патологічних станів. Відомо, що надлишкова загибель клітин спостерігається при інфаркті, інсульті і нейродегенеративних захворюваннях. В даний час накопичені численні дані про те, що тривалість більшості захворювань залежить від рівня апоптотичної активності клітин крові. Кількісним показником готовності клітин до апоптозу вважається доля CD95+ - клітин в крові [18].

Разом з тим з'ясування механізмів апоптозу при різній патології дозволяє не тільки зрозуміти причини захворювань, але і здійснювати направлений пошук способів лікування.

В даний час не існує універсального лікарського препарату, здатного впливати на всі ланки патогенезу розвитку ускладнень ЦД. Золотим стандартом нефропротекторної терапії є інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту (іАПФ); блокатори рецепторів до ангіотензину II (БРА) на фоні адекватного глікемічного контролю [3,9,12]. Проте, існуючі лікувальні схеми не є досконалими,

дозволяють тільки загальмувати розвиток хвороби. Тому безумовно актуальним є пошук нових препаратів, здатних впливати на різні патогенетичні механізми розвитку ДН, зокрема на загибель ниркових клітин. У цьому зв'язку на особливу увагу заслуговують роботи з вивчення фармакологічних ефектів препарату актовегін. — депротейнізованого гемодеривату із телячої крові. Препарат викликає збільшення утилізації і споживання кисню, підвищує енергетичний метаболізм і споживання глюкози тканинами. Сумарний ефект цих процесів полягає в посиленні енергетичного стану клітини, особливо за умов гіпоксії й ішемії [2,6,10].

Клінічна ефективність актовегіну при ЦД була доведена в багатьох контрольованих дослідженнях. Однак, особливості дії даного препарату при ДН вивчені недостатньо.

МЕТА дослідження: вивчення впливу комбінованої терапії з використанням актовегіну на апоптичну готовність лейкоцитів та оцінка нефропротекторних властивостей цього препарату.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ. Було обстежено 80 хворих на ЦД 2 типу з ДН I-IV стадії у віці від 40 до 77 років, середній вік пацієнтів — (54,3±9,2) роки. Діагноз та стадію ДН встановлювали згідно класифікації Mogensen С.Е. (1983 р.) на підставі загальноклінічних методів обстеження (клінічні аналізи крові й сечі, глікемічний профіль, визначення мікроальбумінурії, визначення рівня креатиніну й сечовини в крові й сечі, ультразвукове дослідження паренхіми нирок, вимірювання артеріального тиску). В дослідження включали хворих на ДН, які за рівнями швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) відповідали I-III стадіям хронічної хвороби нирок (ХХН). Стадію ХХН встановлювали згідно класифікації хвороб сечової системи, яка була прийнята II Національним з'їздом нефрологів в 2005 р.

Хворі були розподілені на дві групи в залежності від схем лікування. Перша група складалась з 35 осіб, які отримували базову терапію (антидіабетичні засоби, гіпотензивні препарати - іАПФ або сартани). Для досягнення цільових рівнів артеріального тиску в деяких випадках застосували також антагоністи кальцію та діуретики. [1,8]. До другої групи увійшли 45 осіб, яким крім базової терапії додатково призначали інфузії актовегіну в дозі 800 мг на добу протягом 10 днів.

Контрольну групу склали 10 здорових донорів відповідного віку.

З дослідження виключали осіб з декомпенсацією цукрового діабету, наявністю первинної патології нирок (сечокам'яна хвороба, інфекції сечовідних шляхів, уроджені аномалії нирок), важкими захворюваннями печінки, злюкисними захворюваннями, захворюваннями системи крові.

Визначення мікроальбумінурії проводилось з використанням тест-смужок «Мікроальбуфан» («Pliva-Lachema Diagnostika», Чехія).

Протеїнурію визначали методом Робертса - Стольнікова. Функцію нирок оцінювали шляхом розрахунку ШКФ за формулою MDRD.

Кров для дослідження забирали з ліктьової вени натще в кількості 10мл, стабілізували ЕДТА.

Лейкоцити виділяли шляхом градієнтного центрифугування з периферичної крові хворих ДН і здорових донорів. Кількість CD95+ -клітин оцінювали непрямим імуногістохімічним методом з використанням моноклональних антитіл до антигену CD95 (ТОВ «Сорбент», Москва).

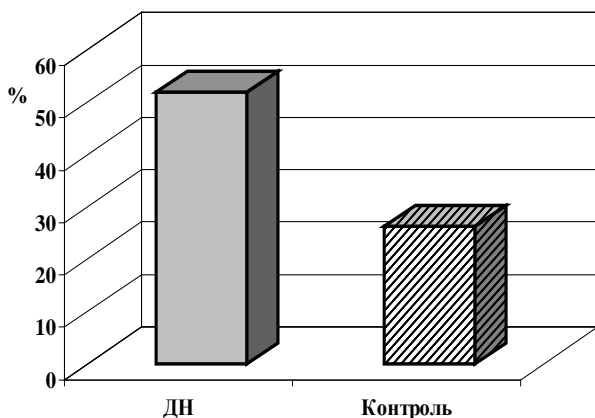
Дослідження вищезазначених показників в обох групах хворих проводили при надходженні хворого до стаціонару та через 1 місяць від початку лікування.

При проведенні дослідження дотримувались права людини, людська гідність та морально-етичні норми у відповідності до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції прав Європи про права людини і біомедицини та відповідних законів України.

Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерних програм «SPSS 13», «Microsoft Excel 2000». Для визначення розбіжностей між групами застосовували методи непараметричної статистики: для зв'язаних вибірок (динаміка лікування) використовували критерій Вілкоксона; для незв'язаних вибірок - критерій Манна-Уїтні. Вірогідними вважали розходження при $p < 0,05$. Дані представлені як середнє значень, що вимірювали у двох паралельних пробах (M), і стандартна помилка (m).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Аналіз результатів дослідження показав, що вміст CD95+ -клітин в периферичній крові хворих на ДН вірогідно вище, ніж у здорових донорів. Кількість CD95+ -лейкоцитів зростала майже в 2 рази в порівнянні з контролем (рис. 1). Так, рівень досліджуваного показника у хворих на ДН становив $(51,9 \pm 4,8)\%$, контроль - $(26,3 \pm 3,5)\%$, ($p < 0,05$).



* - вірогідно у порівнянні з контролем, $p < 0,05$

Рис. 1. Кількість CD95+ -лейкоцитів в периферичній крові хворих на ДН та здорових донорів.

Як свідчать дані літератури, експресія CD95-антигену вивчалась при різних соматичних захворюваннях, зокрема, при гломерунефриті. Експресію CD95 визначали на 5 зразках нормальної нирки та на 80 зразках тканин від хворих з різними типами гломерулонефриту. За допомогою реакції імунофлюоресценції змогли знайти експресію антигену в гломерулах. При гломерулонефриті експресія CD95-антигену підвищувалася. Одночасно з експресією CD95-антигену виявили фрагментацію ДНК в інтрагломерулярних клітинах.

Таким чином, зроблений висновок, що CD95-антиген регулює деякі типи захворювань нирки в людини.

Y. Matsumoto і співавтори досліджували CD95-апоптоз при хронічній нирковій недостатності [13]. Автори висловили гіпотезу, що лімфопенія в цих хворих є результатом апоптозу Т-клітин *in vivo*. Вони аналізували експресію Fas-антигену в уремічних хворих з гемодіалізом і без діалізу. Т-клітини від хворих з уремією значно більше експресували Fas-антиген, ніж Т-клітини здорових людей. Більш того, Т-клітини піддавалися посиленому апоптозу при культивуванні *in vitro*, що корелювало з експресією CD95-антигену.

Значне зниження експресії CD95(Fas/APO-1)-антигену на лімфоцитах на всіх стадіях інсулін-залежного ЦД та у осіб з високим ризиком цього захворювання виявили С. Giordano і співавт. [7].

D.Verzola і співавт. [17] використовували різні методи для дослідження апоптозу і його ефекторів у ниркових біоптатах пацієнтів з II типом цукрового діабету при різних стадіях захворювання. Їх дослідження показало демонстративне підвищення апоптозу та експресії його маркерів в залежності від стадії захворювання. Найвищі показники автори визначали на пізніх стадіях ДН.

Виявлене нами підвищення апоптичної активності імунокомпетентних клітин крові при ДН, імовірно все, асоційовано з хронічною клітинною активацією, викликану різними стимулами: гіперглікемія, уремія, артеріальна гіпертензія, надлишкова продукція інтерлейкінів, ангіотензину й інших патогенних факторів.

В ході нашого дослідження встановлені кореляційні зв'язки між кількістю CD95+ -клітин крові хворих на ДН та найбільш важливими показниками функції нирок. Виявлено достовірні асоціації між ступенем протеїнурії, креатиніном крові та кількістю CD95+ -клітин в крові хворих на ДН (табл. 1). Крім того, встановлено зворотній кореляційний зв'язок швидкості клубочкової фільтрації з числом CD95+ -клітин.

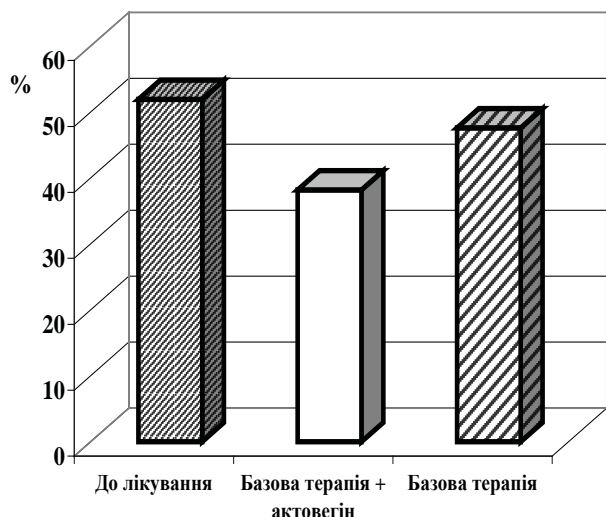
Ці результати можуть свідчити, що апоптична активність імунокомпетентних клітин крові в певній мірі відображає функціональний стан нирок та може бути використана, як маркер розвитку і прогресування ДН та як доповнення до традиційних методів обстеження хворих.

Таблиця 1

Кореляційні взаємозв'язки кількості CD95+-клітин з основними показниками функціонального стану нирок у хворих на ДН

Показник	коефіцієнт кореляції, r	p
протеїнурія, г/л	+ 0,63	< 0,05
креатинін, мкмоль/л	+ 0,70	< 0,01
ШКФ, мл/хв./1,73 м ²	- 0,58	< 0,05

В динаміці лікування апоптична готовність лейкоцитів знижувалась. В групі хворих на ДН, які отримували базову терапію, після курсу лікування спостерігалось зниження кількості CD95+-клітин до (47,6±4,3)%, проте ці зміни не були достовірними, $p > 0,05$. В той же час, додаткове призначення актовегіну приводило до суттєвого зменшення досліджуваного показника до (38,2±4,6)%, $p < 0,01$ (рис. 2).



* - вірогідно у порівнянні з показниками до лікування, $p < 0,05$

Рис. 2. Кількість CD95+-лейкоцитів в периферичній крові хворих на ДН в динаміці лікування.

Важливим параметром нефропротекторної дії лікування є вплив на протеїнурію. Нами було виявлено значні зміни рівня добової екскреції білка у хворих на ДН в динаміці лікування. Так, у пацієнтів, які отримували базову терапію, спостерігався істотний регрес протеїнурії – на 28,5% порівняно з вихідними значеннями. Додаткове застосування актовегіну приводило до зменшення втрат білка з сечею на 35,8%.

Значних розбіжностей у концентрації креатиніну, дисліпідемії, ШКФ в динаміці лікування хворих на ДН виявлено не було. На фоні лікування не відзначено побічних реакцій.

Варто відзначити, що позитивні ефекти актовегіну в лікуванні ускладнень ЦД були доведені також в роботах інших дослідників та при проведенні

експериментальних досліджень. Зокрема, Боярінов Г.А. та співавтори в 2012р. встановили, що актовегін впливає на транспорт та утилізацію кисню та глюкози, активує аеробні шляхи енергетичного метаболізму і, як наслідок, покращує функціональний стан клітин [2,6].

Таким чином, використання препаратів з мультимодальними механізмами дії, таких як актовегін, може відігравати значну роль в лікуванні та профілактиці хворих з ускладненнями ЦД, зокрема ДН.

ВИСНОВКИ. У хворих на ДН значно підвищується експресія CD95 лейкоцитами периферичної крові, що може відігравати важливу роль в розвитку гломерулосклерозу.

Застосування актовегіну в комплексному лікуванні ДН суттєво знижує апоптичну активність лейкоцитів, що може обумовлювати його нефропротекторну дію.

При ДН використання актовегіну на фоні базової терапії супроводжується покращенням загального стану хворих та зменшенням протеїнурії.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом [Текст] : клинические рекомендации / Дедов И. И., Шестаковой. М. В. [и др.] ; под общ. ред. Дедова И. И., Шестаковой. М. В. – 6-е изд. - М. : ООО «Информполиграф», 2013. – 119 с.
2. *Строков И. А.* Актовегин: механизмы действия и эффективность при неврологических осложнениях сахарного диабета / Строков И. А., Федорова О. С., Фокина А. С. [и др.] // *Нервные болезни.* – 2012. – № 3. – С. 21-27.
3. *Топчий І. І.* Застосування резвератролу при лікуванні діабетичної нефропатії / Топчий І. І., Денисенко В. П., Щенявська О. М., Мазій В. В., Бондар Т. М. // *Кровообіг та гемостаз.* – 2012. – № 1-2. – С. 39-44.
4. *Шестакова М. В.* Сахарный диабет и хроническая болезнь почек: достижения, нерешенные проблемы и перспективы лечения / Шестакова М. В., Шамхалова М. Ш., Ярек-Мартынова И. Я. [и др.] // *Сахарный диабет.* – 2011. – № 1. – С. 81-88.
5. *Bo Wang* Transforming growth factor- β 1-mediated renal fibrosis is dependent on the regulation of transforming growth factor receptor 1 expression by let-7b / Bo Wang, Jay C Jha, Shinji Hagiwara [et al.] // *Kidney International.* – 2014. – V. 85. – P. 352-361.

6. *Buchmayer F.* Actovegin: a biological drug for more than 5 decades / Buchmayer F., Pleiner J., Elmlinger M.W. [et al.] // *Actovegin®: Wien Med Wochenschr.* – 2011. – V. 161. – P. 80-88.
7. *Giordano C.* Defective expression of the apoptosis-inducing CD95 (Fas/APO-1) molecule on T and B-cells in 1DDM / Giordano C., De Maria R., Stassi G., Todaro M., [et al.] // *Diabetologia.* – 2010. – V. 38. – № 12. – P.1449-1454.
8. *Huang Y.* Prehypertension and the risk of stroke: a meta-analysis / Huang Y., Cai X., Li Y. [et al.] // *Neurology.* – 2014. – V. 82(13). – P. 1153-1161.
9. *Kumar Sharma.* Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease / Kumar Sharma // *Kidney International Supplements.* – 2014. – N. 4. – P.113-117.
10. *Machicao F.* Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action / Machicao F., Muresanu D. F., Hundsberger H. [et al.] // *J Neurol Sci.* – 2012. – V. 322. – P. 222-227.
11. *Manoocher Soleimani.* Insulin resistance and hypertension: new insights / Manoocher Soleimani // *Kidney International.* – 2015. – V. 87 – I.3. – P. 497-499.
12. *Marpadga A Reddy, Putta Sumanth, Linda Lanting et al.* Losartan reverses permissive epigenetic changes in renal glomeruli of diabetic db/db mice / Manoocher Soleimani // *Kidney International.* – 2014. – V. 85. – P. 362-373.
13. *Matsumoro K.* Induction apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro / Matsumoro K., Schleimer R. P., Suito [et. al.] // *Blood.* – 2012. – V. 86. – P. 1437-1443.
14. *Matthias Mack.* Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis / Matthias Mack, Motoko Yanagita // *Kidney International.* – 2015. – V. 87. – P. 297-307.
15. *Rognant N.* Performance of the chronic kidney disease epidemiology collaboration equation to estimate glomerular filtration rate in diabetic patients / Rognant N., Lemoine S., Laville M., [et al.] // *Diabetes Care.* – 2011. – V. 34. – P. 1320-1322.
16. *Sanchez-Niño MD.* New paradigms in cell death in human diabetic nephropathy / Sanchez-Niño MD., Benito-Martin A., Ortiz A. // *Kidney International.* – 2010. – V. 78(8). – P. 737-744.
17. *Verzola D.* Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy / Verzola D., Gandolfo M.T., Ferrario F. Rastaldi M.P., Villaggio B., Gianiorio F. // *Kidney International.* – 2007. – V. 72. – P.1262-1272.
18. *Wagener F. A.* The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney / Wagener F. A., Dekker D., Berden J. H., Scharstuhl A., Van der Vlag J. // *Apoptosis.* – 2009. – V. – 14(12). – P.1451-1458.

Надійшла до редакції 04.07.2015

Прийнята до друку 23.11.2015