

СОДЕРЖАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ, VE-КАДГЕРИНА И СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА У БОЛЬНЫХ ХБП И ГХ В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ L-АРГИНИНА

УДК 616.61-036.12-085:611-018.74:546.172.6-03

*И.И. Топчий, А.Н. Кириенко, Е.Н. Щенявская,
Н.В. Ефимова, Т.Н. Бондарь, А.В. Лесовая
ГУ "Институт терапии им. Л.Т. Малой" АМН Украины*

Резюме. Мета роботи – вивчення взаємозв'язку показників цілісності та функціонального стану ендотелію у хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН) та гіпертонічну хворобу (ГХ) у динаміці лікування з використанням L-аргініну. Обстежено 112 хворих з артеріальною гіпертензією – із них 48 хворих із хронічним пієлонефритом (ХрПН), 42 хворих із гіпертонічною хворобою (ГХ) II стадії і 22 хворих із гострим коронарним синдромом (ГКС). У динаміці лікування з застосуванням інгібіторів АПФ та блокаторів рецепторів до ангіотензину II в плазмі крові визначали вміст стабільних метаболітів NO, VE-кадгерину (CD-144), фактора Вілебранда (vWF), а також вміст у крові циркулюючих клітин ендотелію. У 27 хворих із ХрПН і 23 хворих із ГХ поряд із базовою терапією призначали тівортин (L-аргінін). Установлено, що застосування препарату для внутрішньовенного введення на тлі загальноприйнятої гіпотензивної та ренопротекторної терапії сприяє покращанню показників цілісності ендотелію та його NO-продукуючої спроможності.

Ключові слова: гіпертензія, хронічна хвороба нирок, ендотелій, L-аргінін.

Одной из чрезвычайно важных функций клеток у большинства, если не во всех органах человека и животных является продукция оксида азота (NO) из L-аргинина. Неспособность клеток производить NO приводит к нарушению кровотока и повреждению органов. Нарушения в системе L-аргинин/NO у больных с хронической болезнью почек (ХБП) характеризуются снижением синтеза NO вследствие дефицита субстрата для NO-синтаз (NOS) – L-аргинина и повышением концентрации эндогенного ингибитора NO-синтаз – асимметричного диметиларгинина (ADMA) [Бабушкина А.В., 2009]. Помимо этого, у больных ХБП снижена биодоступность NO в результате оксидантного стресса и образования пероксинитритов [И.И. Топчий и соавт., 2008]. Вместе с тем, эндотелиальный монослой на внутренней поверхности кровеносных сосудов является не только наибольшей по объему железой внутренней секреции – он служит также полупрони-

цаемым барьером на пути перемещения питательных веществ, сигнальных молекул и клеток крови в ткани. Нарушение барьерной функции эндотелия происходит как за счет сокращения клеток и появления межклеточных щелей, сквозь которые свободно проходят молекулы любого размера, так и в связи с нарушением его регенерации при ускоренном апоптозе клеток, связанном с наличием хронического эндотоксинового дистресс-синдрома [An E.C., 2009; Синяченко О.В., 2007; Mehta D., Malik A.V., 2006]. В течение прошлого десятилетия наиболее доступным морфологическим маркером повреждения эндотелия стали циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК), которые использовались как показатель нарушения целостности эндотелия при множестве заболеваний [Blann A.D., 2005]. Были проведены некоторые исследования при сердечно-сосудистых заболеваниях, приведшие к следующей вехе в методологии – открытию C-Endo-

1-антигена. Соответствующие антитела тогда позволили применять иммуномагнитическое выделение как наиболее достоверную методику (Blann A.D., 2005). Совсем недавно стали использовать сортировку клеток, активизированных флюоресценцией (FACS), а как показатель сосудистого здоровья – рассчитывать соотношение между апоптотными клетками эндотелия (CD-146) и клетками-предшественниками (CD-34) [Woywodt A., 2006]. У этих методик есть свои преимущества и недостатки, продолжают дискуссии относительно правомочности использования CD-34 как показателя эндотелиальных клеток-предшественников [Li B. et al., 2010]. В связи с этим для определения состояния эндотелия у обследованных нами больных дополнительно определяли VE-кадгерин (CD-144), который является строго эндотелиальной молекулой адгезии, расположенной в соединениях между эндотелиальными клетками [Vestweber D., 2008; Dejana E. et al., 2008]. Установлено повышение содержания VE-кадгерина в крови больных с острым коронарным синдромом [Soeki T. et al., 2004; Bernard S. et al., 2009], при васкулитах [Habibagahi Z. et al., 2010], однако взаимосвязь между морфологическими изменениями эндотелия и его NO-продуцирующей функцией остается мало изученной.

Цель работы – установление взаимосвязи нарушений функции эндотелия с показателем целостности эндотелиального монослоя в динамике лечения с применением L-аргинина.

Материалы и методы. Обследовано 112 больных с артериальной гипертензией, из них 61 мужчина (55%) и 51 женщина (45%). Больные в возрасте от 20 до 39 лет составили 22,8 %, от 40 до 59 лет – 62,2 %, 60 и более – 15 %. По нозологическим критериям больные были разделены на следующие группы: 48 больных с хроническим пиелонефритом (ХрПН), 42 больных с гипертонической болезнью (ГБ) II стадии и 22 больных с острым коронарным синдромом (ОКС, группа сравнения). Контрольную группу составили 18 практически здоровых лиц соответствующего пола и возраста. Диагноз ГБ и ОКС устанавливали в соответствии с рекомендациями Украинской ассоциации кардиологов (2004), диагноз хронической болезни почек (ХБП) – согласно классификации Украинской ассоциации нефрологов (2005). Всем больным было проведено комплексное клиническое обследование с учетом жа-

лоб, данных анамнеза, объективных и дополнительных методов исследований: клинические анализы крови и мочи, биохимические показатели – функциональные пробы печени, почек, показатели липидного обмена; электрокардиография в покое, суточное мониторирование АД и ЭКГ, рентгеновизирование органов грудной клетки, количественная двухмерная эхокардиография и эхосоноскопия почек. Изменение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) определяли по пробе Реберга-Тареева.

Кровь для биохимического исследования брали утром, на следующий день после поступления больного в стационар, через 12-18 часов после приема пищи. Забор крови проводили из локтевой вены силиконированной иглой, самотеком, в пробирки на льду с внешними реактивами. Для изучения метаболизма оксида азота исследовали содержание нитрита (NO_2^-), а также сумму стабильных метаболитов NO – ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) в сыворотке крови спектрофотометрическим методом с реактивом Грисса (Орлова Е.А., 2002; Киселик та співав., 2001). Содержание VE-кадгерина (CD-144) в плазме крови больных определяли иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы Bender MedSystems (Австрия), уровень фактора Виллебранда (vWF) – с помощью наборов фирмы Technoclone GmbH (Австрия). Содержание в крови циркулирующих клеток эндотелия определяли по методу Hladovec J., Boos C.J. [Hladovec J., Boos C.J., 2007]. Исследуемые показатели изучали в динамике лечения с применением ингибиторов АПФ и блокаторов рецепторов к ангиотензину II. У больных ОКС исследуемые показатели определялись однократно при поступлении; все остальные больные находились на базовой гипотензивной терапии с применением ингибиторов АПФ, блокаторов рецепторов к ангиотензину II или бета-адреноблокаторов. Дозу препаратов подбирали индивидуально, при необходимости в процессе лечения дозу увеличивали. У 27 больных ХрПН и 23 больных ГБ наряду с базовой терапией применяли L-аргинин (тивортин, производство "Юрия-фарм"). Препарат в виде 4,2 % раствора в количестве 100 мл вводили внутривенно капельно в соответствии с инструкцией производителя. Курс лечения во всех группах составлял в среднем 14-17 дней.

Результаты и их обсуждение. Анализ полученных результатов показал, что плазменная концентрация vWF и VE-кадгерина (CD-

Таблиця 1
Количество ЦЭК, содержание VE-кадгерина и фактор Виллебранда в крови больных (M±m)

Группы больных	Количество ЦЭК, клеток/10 мкл		VE-кадгерин, нг/мл		Фактор Виллебранда, Ед/мл	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
ГБ II ст.	13,2 ± 2,9 (n=49)	10,8 ± 1,5 (n=16)	0,810 ± 0,122 (n=18)	0,443 ± 0,059* (n=14)	0,520 ± 0,049	0,508 ± 0,073
ХрПН	18,5 ± 2,8 (n=26)	13,0 ± 1,4* (n=15)	1,112 ± 0,246 (n=24)	0,535 ± 0,125* (n=20)	0,526 ± 0,029	0,561 ± 0,054
ОКС	20,1 ± 2,5 # (n=11)	-	1,109 ± 0,095 # (n=11)	-	0,698 ± 0,076 #	-

Примечание. 1. * $p < 0,05$ по сравнению с показателями до лечения;
2. # $p < 0,05$ по сравнению с показателями в группе с ГБ.

144), а также количество ЦЭК у больных с ОКС была достоверно выше, чем у больных с ГБ II (табл. 1). Это свидетельствует о том, что содержания VE-кадгерина и фактора Виллебранда изменяются синхронно с нарушением целостности эндотелия в коронарных артериях. Такая же тенденция отмечена и при подсчете количества циркулирующих клеток эндотелия – см. табл. 1. Значительных половых и возрастных различий по этим показателям выявлено не было. По данным регрессионного анализа, взаимосвязи между плазменной концентрацией vWF и CD-144, сывороточным альбумином и содержанием гемоглобина у больных выявлено не было.

Концентрация нитрита была снижена как в группе с ГБ, так и с ХрПН (на 26,9 % и 17,8 %, соответственно, $p < 0,05$), тогда как сумма (нитрит+нитрат) в группе больных с ГБ не отличалась от контроля, а в группе с ХрПН была выше контрольных значений на 26,0 % ($p < 0,05$), вероятно за счет активации индуцибельного звена синтеза NO. Содержание NO в плазме крови больных с ОКС достоверно не отличалось от контроля, но характеризовалось высокими значениями разброса данных.

У больных ХрПН и ГБ скорость клубочковой фильтрации коррелировала с содер-

жанием в крови стабильных метаболитов NO, что может говорить о снижении возможности буферного накопления NO у пациентов с более выраженными изменениями в структуре эндотелия (табл. 2).

Снижение концентрации стабильных метаболитов NO в крови может быть обусловлено снижением синтеза оксида азота в результате дефицита субстрата NO-синтаз – L-аргинина, что было установлено нами в предыдущих исследованиях [Топчий І.І. та співав., 2008]. Можно предположить также, что одной из причин снижения концентрации стабильных метаболитов оксида азота в крови является нарушение регенеративной способности эндотелия и снижение утилизации десквамированного эндотелия у больных с более тяжелым течением заболевания. В литературе последних лет сообщается об отрицательном влиянии повышения уровня пула циркулирующих клеток эндотелия на течение заболеваний сердечно-сосудистой системы [Puddu P. et al., 2010]. О напряженности врожденного иммунитета у обследованных больных свидетельствует повышение агрегационных свойств нейтрофилов. Так у здоровых пациентов индекс их агрегации составил $15,1 \pm 1,2$ % и

Таблиця 2
Динамика содержания нитрита (NO_2) и суммы нитрит/нитрат (NO_2+NO_3) в плазме больных (M + m)

Группа больных	До лечения		После лечения	
	NO_2 , мкмоль/л	(NO_2+NO_3), мкмоль/л	NO_2 , мкмоль/л	(NO_2+NO_3), мкмоль/л
Контроль, n=20	2,75 ± 0,15	37,79 ± 1,74	-	-
ГБ II, n=66	2,01 ± 0,17	36,89 ± 4,89	2,11 ± 0,59	49,54 ± 8,59
ХрПН, n=33	2,26 ± 0,17	47,63 ± 5,35	2,30 ± 0,16	40,49 ± 6,46
ОКС, n=11	2,41 ± 0,37	33,00 ± 11,45		

Примечание. 1. * по сравнению с контролем;
2. # $p < 0,05$ по сравнению с показателем до лечения.

Таблиця 3
Індекс агрегації нейтрофілов у больных ХрПН і ГБ (M±m)

Групи	Індекс агрегації нейтрофілов, %	
	До лікування	Після лікування
Контроль (n=18)	15,1 ± 1,2	-
ГБ II-III ст. (n=28)	19,4 ± 1,8	17,2 ± 1,3
ХБП (n=32)	24,7 ± 3,1*	17,4 ± 2,1#

Примечание. 1.* $P < 0,05$ по сравнению с контролем;
2.# $P < 0,05$ по сравнению с показателями до лечения.

повищувався у больных ХрПН в 1,5 рази ($p < 0,05$) – см. табл. 3.

Застосування стандартної ренопротекторної терапії оказувало достаточний по ефективності клінічний результат – во всіх досліджуваних групах відзначили позитивне впливання лікування з застосуванням інгібіторів АПФ, блокаторів рецепторів ангіотензину II на СКФ і артеріальне тиск. Так, СКФ у больных ХрПН з $86,7 \pm 7,1$ мл/хв зросла при стандартній терапії до $97,4 \pm 7,2$ мл/хв. Разом з тим, найбільший ефект оказало застосування комбінованої терапії в поєднанні з тивортином: СКФ зросла з $95,7 \pm 5,8$ мл/хв до $114,5 \pm 7,0$ мл/хв ($p < 0,05$). По-видимому, існує тісне взаємодія системи L-аргінин/оксид азота і РАС в регуляції гломерулярного артеріального опору і ниркової гемодинаміки в цілому. Гломерулярний мезангіум розглядається в нинішній час як головний регулятор швидкості гломерулярної фільтрації, зміна тону мезангіальних клітин і судин нирки в відповідь на зміни в системі L-аргінин/NO оказує суттєвий вплив на капілярний ультрафільтраційний коефіцієнт. При цьому викликане ангіотензином II скорочення мезангіальних клітин може бути зменшено в зв'язі з посиленням продукції NO ендотелієм під впливом тивортина, що узгоджується з літературними даними про гальмування впливання асиметричного диметиларгініну – блокатора NOS - L-аргініну [Teerlink T. et al., 2009]. Під впливом лікувальної терапії, поряд зі зниженням АД і зменшенням протеїнурії, відбувалася перебудова в співвідношенні стабільних метаболітів оксиду азота (табл.1). Відзначений дисбаланс в метаболізмі оксиду азота, під впливом терапії

зменшилася, при застосуванні тивортина у больных з ХрПН і ГБ відбулося зростання концентрації нітритів ($p < 0,05$), сумми (нітрит+нітрат) ($p < 0,05$). В кінці періоду спостереження виявлено позитивну кореляційну зв'язь між концентрацією сумми нітрит+нітрат і рівнем АД ($r = +0,52$, $p < 0,05$), що може бути пов'язано з збільшенням синтезу NO або звільненням NO з депо під впливом проводимої терапії. Можливо, це пов'язано і з покращенням регенераційної здатності ендотелію, так як вміст циркулюючих клітин ендотелію при призначенні тивортина зменшувалося більш суттєво, ніж при проведенні стандартної терапії (табл. 1).

Відомо, що NO грає важливу і унікальну роль в функціонуванні нирки, він оказує своє діяння на кровотік не тільки як магістральне судорозширююче засіб, але і як постійний антагоніст різних вазоконстрикторів в системі капілярів нирки [Yu B. et al, 2010]. Зниження синтезу оксиду азота або зменшення його біодоступності при ХБП призводить до порушення перфузії тканин нирки, яка і так уже зменшена в зв'язі з фіброзуючим процесом [Wen X. et al., 2010]. Крім того, хронічні запальні захворювання нирки можуть призводити до несостатності міжклітинних контактів ендотеліоцитів як це відбувається при ішемії, сепсисі, токсемії, різних алергічних станах [Lampugnani M.G. et al., 1993; Cohen R.I. et al., 2001; Heemskerk S., 2006]. В той же час, саме запалення як захисна реакція організму включає в себе компонент активації клітин білої крові і підвищення активності індукцибельної NOS, що призводить до локальному підвищенню проникності мікросудин з метою ліквідації причини запалення. К агентам, викликаючим підвищення проникності судинного ендотелію, відносяться тромбін, гістамін, фактор зростання судинного ендотелію (VEGF), брадікінін, бактеріальний ендотоксин, фактор некрозу опухолі, активні форми кислорода, надмірна механічна деформація. Ці речовини діяють в різних патологічних контекстах і по різних механізмах, але призводять до єдиного результату – модуляції бар'єрної функції ендотелію судин за рахунок зміни контактних взаємодій ендотеліальних клітин.

Раніше нами було встановлено, що у больных ХБП спостерігається суттєве зниже-

ние по сравнению с контрольной группой уровня L-аргинина [Топчий И.И. и соавт., 2006]. Следствием ограничения доступности субстрата для NO-синтаз является обнаруженное нами снижение уровня маркера эндогенного синтеза NO-нитрита: на 21,5 % при ХрПН ($p < 0,05$) и на 12,8 % при ГБ ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Кроме того, оксидантный стресс приводит к разобщенности NO-синтаз, с увеличением активности iNOS при наличии воспалительного процесса в почках [Топчий И.И. и соавт., 2009].

Основное биологическое действие ADMA – ингибирование синтеза NO и теоретически такое ингибирование может быть преодолено воздействием больших доз L-аргинина, которая является субстратом для NO-синтаз. Однако, противодействие ADMA только большими дозами L-аргинина, по-видимому, не является адекватным вмешательством для ограничения кардиотоксических влияний этого вещества.

Конститутивные изоформы NOS – восприимчивы к ингибирующему влиянию повышенного уровня NO и некоторые исследователи предположили, что воспаление может вызвать iNOS-зависимое уменьшение активности eNOS, что приводит к ухудшению капиллярного гомеостаза и функции почек [Schwartz D., 1999]. Другими словами, локальные микромолярные концентрации NO не могут оказывать существенного влияния на активность iNOS, но могут фактически ингибировать активность eNOS, усиливая чувствительность почек к действию вазоконстрикторов и уменьшая почечный кровоток в результате увеличенного сосудистого сопротивления. Эта селективная разобщенность NOS приводит к нарушению авторегуляции, что может привести к преренальному снижению СКФ при ХБП. Уменьшение активности eNOS полностью предотвращалось при селективном ингибировании iNOS *in vitro* и *in vivo* [Heemskerk S. et al., 2009]. Однако, определенное количество NO необходимо для сохранения СКФ при эндотоксемическом шоке, учитывая его сосудорасширяющие эффекты на приводящую артериолу [Chauhan S.D., 2003]. В дополнение к гемодинамическим эффектам даже небольшое количество эндогенного NO предотвращает гломерулярный тромбоз при эндотоксинемии у крыс. По этим причинам селективное ингибирование iNOS, оставляя неизменным физиологическое содержание eNOS, может быть новым подходом для лечения бо-

лезни почек [Schwartz D., 1997]. Положительное влияние тивортина может быть связано и с метаболизмом L-аргинина, так как по данным R.Komers et al. (2003) инфузия L-аргинина субстрата для eNOS и конкурента ADMA – у практически здоровых добровольцев нормализовала АД. Эти данные согласуются с наблюдением [Watanabe G. et al., 2000], которые установили, что назначение L-аргинина приводило к улучшению почечной функции, что было расценено авторами как дополнительное влияние лечения на окислительный стресс.

Выводы. 1. У больных острым коронарным синдромом, хроническим пиелонефритом и гипертонической болезнью повышается количество циркулирующих эндотелиальных клеток и содержание VE-кадгерина в плазме крови, что свидетельствует о нарушении целостности эндотелиального монослоя как в капиллярах почек, так и в артериальных сосудах.

2. Одновременно с нарушением целостности эндотелия у больных ОКС, ХрПН и ГБ снижается содержание в плазме крови стабильных метаболитов NO_2 и NO_3 , что может быть обусловлено как уменьшением активности eNOS, так и снижением содержания субстрата для NOS – L-аргинина.

3. Применение препарата тивортин (L-аргинин) для внутривенного введения на фоне общепринятой гипотензивной и ренопротекторной терапии способствовало улучшению показателей целостности эндотелия и его NO-продуцирующей способности.

Литература

1. Ан Е.С., Миронов А.В., Петухов В.А., и соавт. Дисфункция эндотелия при липидном дистресс – синдроме и дисметаболических последствиях перитонита. РМЖ. - 2009. - №17(22). - 881 с.
2. Бабушкина А.В. L-аргинин с точки зрения доказательной медицины. Укр. мед. часопис. - 2009. - №6(74). - С. 43-48.
3. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології. Лабораторна діагностика. - 2001. - №3. С. 43-45.
4. Орлова Е.А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности. Укр. журнал екстремальної медицини ім. Г.О. Можаяева. - 2002. - №3(1). - С. 79-82.
5. Сияченко О.В., Зяблицев С.В., Чернобривцев П.А. Роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе мезангиальных гломерулонефритов. Укр. журнал нефрології та діалізу. - 2007. - №2(14). - С. 36-38.

(Полный перечень литературы – в редакции)