

К.У. Вильчук

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОЛИ ОКСИДА АЗОТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО И
МАКРОФАГАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МЕХАНИЗМАХ
РАЗВИТИЯ ПИЕЛОНЕФРИТА У ДЕТЕЙ**

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»¹

У 80% детей с пиелонефритами диагностирована дисфункция эндотелия в виде снижения продукции оксида азота эндотелием.

Только у детей с пиелонефритами и с дисфункцией эндотелия обнаружено увеличение в крови уровня стабильных метаболитов оксида азота, как показателя суммарной продукции оксида азота в организме. Результаты показывают, что в патогенезе пиелонефрита у детей важная роль принадлежит снижению продукции оксида азота эндотелием и повышению его продукции макрофагами.

Ключевые слова: дети, пиелонефрит, стабильные метаболиты оксида азота, дисфункция эндотелия.

K.U. Vilchuk

DETERMINING OF THE ROLE OF THE ENDOTHELIUM AND MACROPHAGAL NITRIC OXIDE AT THE MECHANISMS OF THE DEVELOPMENT OF THE PYELONEPHRITIS AT CHILDREN

At investigation of 100 children with pyelonephritis the functional test with reactive hyperemia was used, the level of the stable metabolites of the nitric oxide at the blood was determined. At 80% children with pyelonephritis the endothelium dysfunction was found.

At children with pyelonephritis and endothelium dysfunction the level of the stable metabolites of nitric oxide as parameters of the summary production of the nitric oxide was found. It was revealed that important role at pathogenesis of pyelonephritis decrease of the nitric oxide production by endothelium and increase its producing by macrophages was play.

Key words: children, pyelonephritis, stable metabolites of the nitric oxide, dysfunction endothelium.

Заболевания органов мочевой системы – одна из наиболее актуальных проблем современной медицины и, в первую очередь, педиатрии. По данным ВОЗ патология органов мочевой системы у детей занимает второе место после заболеваний респираторного тракта [2]. Однако патогенез пиелонефрита, как наиболее распространенной нозологической формы патологии мочевой системы, на наш взгляд, изучен недостаточно. Существующие представления о механизмах развития пиелонефрита сводятся преимущественно к воспалению, природа которого имеет микробный характер [11]. Важное значение в развитии пиелонефрита имеют застой мочи, нарушения венозного и лимфатического оттока из почки. В последние годы латентный, недиагностируемый и торпидный к лечению пиелонефрит, а также комбинированный гломерулонефрит-пиелонефрит становятся бичом здоровья общества, так как симптоматическая гипертензия, вызванная поражением почек, переходит в гипертоническую болезнь. Очевидно, недостаточная эффективность проводимой терапии может быть обусловлена недостаточными представлениями о механизмах развития данного заболевания.

Расшифровка основных биологических свойств оксида азота – создаёт основу и открывает новые перспективы в детализации патогенеза заболеваний почек, а, следовательно, и их лечения [4, 13]. Известно, что субстратом оксида азота является аминокислота L-аргинин. Синтез оксида азота осуществляется путём превращения L-аргинина в L-цитруллин. Образование оксида азота происходит при участии трёх изоформ NO-синтаз (NOS): двух конституциональных (эндотелиальная – eNOS и нейрональная – nNO) и одной индуцибельной (макрофагальная – iNOS). Доказано, что активность eNOS и nNOS обеспечивает фоновый или базальный уровень оксида азота в крови. В обычных условиях макрофагальная форма NOS также опосредует базальный синтез оксида азота, а при стимуляции цитокинами – количество оксида азота в плазме резко возрастает [9].

Оксиду азота принадлежит множество различных биологических функций: прежде всего – это важнейший фактор вазодилатации сосудов [3, 14]. Также он опосредует регуляцию сосудистого тонуса через нитрические нервные волокна, осуществляющие неадренергическую, нехолинергическую вазодилатацию, выполняя роль нейромедиатора. Оксид азота осуществляет антиагрегационные и антиадгезивные эффекты, регулируя тем самым реологические свойства крови.

Оксид азота может оказывать как защитное, так и по-

вреждающее действие, выступая и как сигнальная молекула, и как токсин, что зависит от его концентрации [4].

В небольших концентрациях оксид азота обладает антиоксидантными, антитромботическими, а также антиадгезивными эффектами, что важно для обеспечения нормального кровотока. Вследствие недостаточного образования оксида азота – активируются прооксидантные, тромботические и другие эффекты повреждения.

С другой стороны доказано, что в избыточных количествах оксид азота проявляет неблагоприятные (цитотоксические, прооксидантные, провоспалительные, прокоагулянтные) свойства.

Механизмы повреждения клеток при гиперпродукции оксида азота универсальны. Избыточные количества оксида азота подавляют ферменты дыхательной цепи, цикла Кребса и синтеза ДНК. Если наномолярные концентрации оксида азота вызывают обратимое ингибирование митохондриального дыхания, то микромолярные концентрации оксида азота, образующиеся при участии индуцибельной формы NO-синтазы, вызывают необратимые изменения ферментов дыхательной цепи [7].

Прооксидантное действие оксида азота связано со способностью образовывать мощный прооксидант пероксинитрит [12]. Мощным активатором iNOS, продуцирующей во много раз большее количество молекул оксида азота, чем при участии конститутивных её изоформ, являются липополисахариды грамотрицательных бактерий, являющиеся основным этиологическим фактором микробно-воспалительных заболеваний почек [13, 17].

В плазме крови больных сепсисом также выявляются повышенные концентрации нитратов и нитритов – стабильных метаболитов NO [8]. Именно с гиперпродукцией оксида азота связано резкое падение кровяного давления при септическом шоке [8, 18].

Установлено, что молекула оксида азота обладает чрезвычайно широким спектром действия, вплоть до воздействия на генетический аппарат [16]. Установлено, что высокие или субкритические (микромолярные) концентрации оксида азота, образующиеся iNOS, вызывают необратимые изменения ферментов дыхательной цепи и подавление пирuvatдегидрогеназы, синтеза ДНК [6].

Итак, имеющиеся данные литературы дают основание полагать, что одним из патогенетических механизмов клинических синдромов при пиелонефритах могут быть нарушения в гомеостазе оксида азота, что может вызвать ряд неблагоприятных последствий [15]. В связи с этим опреде-

ление уровня стабильных метаболитов оксида азота может иметь значение для выяснения его роли в генезе нарушений при пиелонефритах у детей.

Целью работы является выяснение роли оксида азота эндотелиального и макрофагального происхождения в механизмах развития пиелонефрита у детей.

Материал и методы

Всего находилось под наблюдением 140 детей: 100 детей с пиелонефритами от 3 до 18 лет, проходивших стационарное лечение в условиях УЗ «ДОКБ» г. Гродно (основная группа) и 40 практически здоровых детей (контрольная группа). Группы обследованных детей не отличались между собой ($p > 0,05$) по возрастному и массо-ростовому показателям.

При помощи функционального теста с реактивной гиперемией у всех детей осуществлена оценка NO-синтазной активности эндотелия сосудов, а по концентрации в крови продуктов деградации оксида азота или его стабильных метаболитов ($[NO_x]$) – изучена суммарная продукция данной молекулы в организме. У пациентов с пиелонефритами эти исследования выполнены на фоне комплексной клинической оценки функционального состояния почек.

По результатам теста с реактивной гиперемией из детей с пиелонефритами основной группы были сформированы подгруппы пациентов с пиелонефритами и с дисфункцией эндотелия (1-я подгруппа, $n=80$) и без дисфункции эндотелия (2-я подгруппа, $n=20$), которые также не отличались между собой ($p > 0,05$) по возрастному и массо-ростовому показателям.

Оценку продукции оксида азота эндотелием сосудов у всех детей и подростков в условиях реовазографического исследования пульсового кровотока предплечья осуществляли путем выполнения теста с реактивной гиперемией и пробы с нитроглицерином по общепринятой методике в модификации [1] на реоанализаторе (Реоанализатор 5А-05, Украина). Выраженность зависимой от эндотелия дилатации сосудов в тесте с реактивной гиперемией определяли по степени максимального увеличения пульсового кровотока ($PK_{\text{макс.}}$) в предплечье в первые 2 минуты восстановления кровотока после 4-х минутной окклюзии плечевой артерии. Окклюзия плечевой артерии достигалась путем наложения на плечо манжеты тонометра и повышения в ней давления на 50 мм рт. ст., превышающего зарегистрированные у обследуемого значения систолического артериального давления. В качестве контроля использовали оценку степени прироста кровотока в предплечье у детей в ответ на прием нитроглицерина (0,01 мг/кг), который характеризует состояние эндотелий независимых или миогенных механизмов вазодилатации сосудов предплечья. Увеличение пульсового кровотока в предплечье менее 10% трактовали как снижение NO-синтазной активности эндотелия и констатировали наличие у пациентов дисфункции эндотелия. Данное заключение было правомочным при обнаружении увеличения пульсового кровотока в предплечье на 19% и больше после приема нитроглицерина, что свидетельствовало о сохранении гуанилатциклазного или эндотелий-независимого механизма дилатации сосудов.

Образование оксида азота в организме оценивали по концентрации в крови продуктов деградации оксида азота (или его стабильных метаболитов или нитритов и нитратов – $[NO_x]$) общепринятым спектрофотометрическим методом («Specord», Германия) с использованием кадмия и реактива Грисса [10].

Полученные результаты обработаны статистически с использованием методов параметрической и непараметрической статистики: критериев Wilcoxon, Mann-Whitney, t-критерия Стьюдента, корреляционного анализа по Spearman при уровне значимости $p < 0,05$ и представлены в виде средней

и среднеквадратичного отклонения ($M \pm \text{STD}$) [5].

Результаты и обсуждение

Концентрация стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови у пациентов с пиелонефритами основной группы составила $23,6 \pm 4,63$ ммоль/л и была статистически значимо выше, чем у детей контрольной группы ($17,5 \pm 5,21$ ммоль/л, $p < 0,001$) (таблица 2). Концентрация стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови у детей с пиелонефритами с дисфункцией эндотелия составила $24,9 \pm 3,49$ ммоль/л, что оказалось также выше, чем у детей с пиелонефритами без дисфункции эндотелия ($18,0 \pm 4,83$ ммоль/л, $p < 0,01$) и в контрольной группе ($p < 0,01$) (таблица 2).

У детей без дисфункции эндотелия $[NO_x]$ не отличалась от показателя в контроле, составив $18,0 \pm 4,83$ ммоль/л ($p > 0,05$). Увеличение в крови детей с пиелонефритами с дисфункцией эндотелия уровня стабильных метаболитов оксида азота свидетельствует о гиперпродукции оксида азота, в то время как у детей, не имеющих дисфункции эндотелия этот показатель не изменялся.

Исходя из полученных данных, можно предполагать, что гиперпродукция оксида азота может иметь важное значение в усилении десквамации эндотелия кровеносных сосудов. Многие из патогенных эффектов оксида азота реализуются через образование высокоточного соединения пероксинитрита [18]. Пероксинитрит ($ONOO\cdot$), как и оксид азота, вносит существенный вклад в протекание патологических процессов в почках. Он обладает гораздо большей реакционной способностью, чем оксид азота и супероксидный радикал, участвует в нитрозилировании тирозина и цистеина в различных белках, инициации перекисного окисления липидов, инактивации аконитаз, подавлении транспорта электронов в митохондриях и в окислении биологических тиолов. Нитрозилирование тирозина под влиянием пероксинитрита ухудшает фосфорилирование и аденилирование белков, в результате чего нарушаются процессы внутриклеточной сигнализации. Пероксинитрит активирует апоптоз. В отличие от доноров оксида азота пероксинитрит активирует агрегацию тромбоцитов.

Пероксинитрит неферментативным путем может окислять липопротеиды артериальной стенки, тем самым способствуя повреждению сосудистого эндотелия. Высокие концентрации оксида азота и образование из него продуктов с окислительными свойствами, в том числе и пероксинитрита, могут явиться причиной повреждения эндотелия сосудов. Установлено, что высокие концентрации оксида азота не только обуславливают выраженный эффект вазодилатации, но также могут оказывать повреждающее действие на эндотелий сосудов с развитием их стойкой вазоконстрикции.

Таким образом, по результатам теста с реактивной гиперемией у подавляющего большинства детей с ПН (80%) обнаружено снижение продукции оксида азота эндотелием или диагностирована дисфункция эндотелия. Причем только у пациентов с ПН и с дисфункцией эндотелия обнаружено статистически значимое увеличение суммарной продукции оксида азота в организме. Принимая во внимание, что продукция оксида азота эндотелием у данной категории пациентов патологически снижена (в силу морфологического повреждения эндотелия либо его функциональной блокады), следует констатировать: гиперпродукция оксида азота у пациентов с пиелонефритами обусловлена повышением активности макрофагальной NO-синтазы, обладающей выраженными индуцибельными свойствами.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что в патогенезе развития пиелонефрита у детей важная роль принадлежит снижению продукции оксида азота эндотелием и повышению его продукции макрофагами. Предполагается, что микрофлора, воздействующая на организм ребенка приводит к повышению активности макрофагальной NO-синта-

зы, которая многократно увеличивает в очаге воспаления продукцию оксида азота, способствуя образованию свободнорадикальных продуктов (в том числе и пероксинитрита), которые оказывают как местное – на ткань почки, так и системное – на эндотелий сосудов повреждающее действие. В последнем случае развивается дисфункция эндотелия, которая сопровождается патологическим снижением эндотелий-зависимой вазодилатации и развитием системной вазоконстрикции с явлениями артериальной гипертензии. Системная вазоконстрикция, в свою очередь, приводит к ухудшению перфузии тканей (особенно в органе-мишени-почках), замедлению элиминации микрофлоры из очага воспаления и усилению оксидативного стресса с явлениями цитодеструкции – формируя порочный круг и способствуя более глубоким патоморфологическим повреждениям почечной ткани и эндотелия.

Литература

1. Вильчук, К.У. Функциональные пробы, применяемые в диагностике дисфункции эндотелия / К.У. Вильчук, Н.А.Максимович, Н.Е. Максимович // Методические рекомендации МЗ РБ. Гродно, 2001. 19 с.
2. *Здравоохранение в Республике Беларусь* / Официальный статистический сборник за 2007 г.; ред.: О.С. Капранова [и др.]. Минск: ГУ РНМБ, 2008. 300 с.
3. Петрищев, Н.Н. Физиология и патофизиология эндотелия / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов // Дисфункция эндотелия: причины, механизмы, фармакологическая коррекция; под ред. Н.Н. Петрищевой СПб.: Изд-во СПбГМУ. 2003. С. 4 – 39.
4. Проскураков, С.Я. Биология окиси азота / С.Я. Проскураков, А.Г. Конопляников, А.И. Иванников // Успехи соврем. биологии. 1999. Т. 119, № 4. С. 380 – 395.
5. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ статистика / О.Ю. Реброва. Москва: Медиа Сфера, 2002. 312 с.
6. Brooks, K.J. Nitric-oxide-induced inhibition of mitochondrial complexes following aglycaemic hypoxia in neonatal cortical rat brain slices /

K.J. Brooks, I.P. Hargreaves, T.E. Bates // *Developmental Neuroscience*. 2000. Vol. 22, № 5 – 6. P. 359 – 365.

7. Brown, G.C. Nitric oxide inhibition of cytochrome oxidase and mitochondrial respiration: implications for inflammatory, neurodegenerative and ischemic pathologies // *Mol. Cell. Biochem*. 1997. Vol. 174 (1 – 2). P. 189 – 192.

8. Evans, T. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome / T. Evans // *Circ. Shock*. 1993. Vol. 41. P. 77 – 81.

9. Galea, E.A. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity cultures of rat astrocytes / E.A. Galea, D.L. Feinstein, D.J. Reis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. P. 10945 – 10949.

10. Granger, D.L. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction / D.L. Granger [et al.] // *Methods in Enzymology*. 1996. Vol. 268. P. 142 – 151.

11. Kanellopoulos, T.A. First urinary tract infection in neonates, infants and young children: a comparative study / T.A. Kanellopoulos, C. Salakos, I. Spiliopoulou, A. Ellina // *Pediatr. Nephrol*. 2006. Vol. 21 (8). P. 1131 – 1137.

12. Kawano, T. iNOS-derived NO and nox 2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite / T. Kawano // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2007. Vol. 27, № 8. P. 1453 – 1462.

13. Kiechle, F.L. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection / F.L. Kiechle, T. Malinski // *Am. J. Clin. Pathol*. 1993. Vol. 100 (5). P. 567 – 575.

14. Ku, D.D. Nitric oxide-and nitric oxide donor-induced relaxation // *Methods in Enzymology*. 1996. Vol. 269. P. 107 – 119.

15. Kurutas, E.B. The effects of oxidative stress in urinary tract infection / E.B. Kurutas, P. Ciragil, M. Gul, M. Kilinc // *Mediators Inflamm*. 2005. Vol.4. P. 242 – 244.

16. Li, H. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease / H. Li, U. Forstermann // *J. Pathol*. 2000. Vol. 190. P. 244 – 254.

17. Moncada, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator and pathophysiological entity / S. Moncada // *J. Lab. Clin. Med*. 1992. Vol. 120. P. 187 – 191.

18. Virdis, A. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress / A. Virdis [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2005. Vol. 312, № 3. P. 945 – 953.