

## ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ С ЭКЗОГЕННЫМИ ТОКСИЧЕСКИМИ НЕФРОПАТИЯМИ

Демидчик Л.А.<sup>1</sup>, Клочкова Е.В.<sup>1</sup>, Рассохина Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Карагандинский государственный медицинский университет (КГМУ), Караганда, e-mail: Lusenok2008@mail.ru

Окислительный стресс рассматривается в качестве одного из возможных механизмов развития осложнений острых отравлений. Однако маркеры окислительного стресса нейтрофилов при алкогольной нефропатии мало изучены. Целью нашей работы было изучение маркеров окислительного стресса нейтрофилов у пациентов с токсическими нефропатиями, вызванными острым отравлением алкоголем и уксусной кислотой. В качестве маркеров окислительного стресса оценивалась активность ферментов каталазы и миелопероксидазы, а также содержание окисленно-модифицированных белков: карбонильных производных и продуктов глубокого окисления белков (advanced oxidative protein products, AOPP). Были выявлены различные тренды и разнонаправленные изменения в уровне маркеров окислительного стресса нейтрофилов у больных с токсическими нефропатиями, обусловленные в том числе степенью тяжести отравления. Было выявлено повышение активности каталазы у пациентов с токсическими нефропатиями, вызванными острым отравлением алкоголем, четко коррелирующей со степенью тяжести отравления. Мы предположили, что благодаря антиоксидантному действию фермента и его способности окислять низкомолекулярные спирты в присутствии пероксида водорода, нейтрофилы повышают не только свою защиту, но и помогают утилизировать избыток этанола в организме, предупреждая его прямое токсическое действие, то есть наблюдалась активация детоксикационной функции нейтрофилов.

Ключевые слова: токсическая нефропатия, отравления уксусной кислотой, острая алкогольная интоксикация, нейтрофилы, окисленные белки.

## THE STUDY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH EXOGENOUS TOXIC NEPHROPATHIES

Demidchik L.A.<sup>1</sup>, Klochkova E.V.<sup>1</sup>, Rassokhina E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KSMU, Karaganda state medical university, Karaganda, e-mail: Lusenok2008@mail.ru

Oxidative stress is considered as one of the possible mechanisms for the development of acute poisoning complications. However, oxidative stress markers of neutrophils in case of alcohol nephropathy have been little studied. The purpose of our work was to study the oxidative stress markers of neutrophils in patients with toxic nephropathies caused by acute alcohol and acetic acid poisoning. As oxidative stress markers the activity of catalase and myeloperoxidase, as well as the content of oxidized modified proteins: carbonyl derivatives and advanced oxidative protein products (AOPP) were studied in neutrophils. Various trends and multidirectional changes in the level of oxidative stress markers of neutrophils were identified in patients with toxic nephropathies, caused by the severity of poisoning. An increase in catalase activity was found in patients with toxic nephropathies caused by acute alcohol poisoning, which clearly correlates with the severity of poisoning. We assumed that due to the antioxidant effect of catalase and its ability to oxidize low molecular weight alcohols in the presence of hydrogen peroxide, neutrophils increase not only their own protection, but also help to utilize excess ethanol in the body, preventing its direct toxic effect, thus, activation of the neutrophil detoxification function was observed.

Keywords: toxic nephropathy, acetic acid poisoning, acute alcohol intoxication, neutrophils, oxidized proteins.

В современном обществе большой социальной проблемой являются острые экзогенные отравления. Наиболее подвержены им трудоспособные, а также фертильные слои населения, что влечет за собой как материальные затраты, так и наносит огромный урон в общечеловеческом плане. Несмотря на развитие комплексных мер по лечению и профилактике острых отравлений, открытию специализированных клиник и отделений, число ранних и отдаленных осложнений растет, а летальность продолжает сохраняться на

высоком уровне, что выводит эту проблему на первый план. Одним из распространенных патологических синдромов при острых экзогенных отравлениях является токсическая нефропатия - поражение клубочкового аппарата и ткани почек, спровоцированное действием экзогенных нефротоксинов [1]. В структуре острых экзогенных отравлений отравления лекарственными препаратами составляют 44,73%, алкогольсодержащей продукцией - 34,67%, прижигающими жидкостями - 6,21% [2]. К основным осложнениям отравлений относится острая почечная недостаточность (ОПН), часто являющаяся причиной смерти из-за некроза почек и полного отказа их функции. Стоит отметить, что молекулярные механизмы повреждения почек в данных случаях по-прежнему плохо изучены. Неблагоприятные исходы ОПН не исчерпываются высокой смертностью. Результаты метаанализа последних лет свидетельствуют, что пациенты после перенесенного ОПН имеют более высокий риск развития хронической болезни почек (ХБП) и терминальной почечной недостаточности (ТПН) [2]. Таким образом, факт перенесения ОПН определяет не только плохой прогноз, но и связан с существенными дополнительными расходами на госпитальное лечение. Оказание квалифицированной медицинской помощи требует больших материальных затрат. По скромным оценкам, на стационарное лечение больных с алкогольным отравлением только в России затрачено более 550 млн [3]. Отравления уксусной кислотой признаны наиболее тяжелыми по клиническому течению и неблагоприятными по исходам в структуре острых экзогенных отравлений химической природы [4]. Основываясь на эпидемиологической картине отравлений этанолом и уксусной кислотой, изучение механизмов их влияния на организм является весьма актуальным.

Окислительный стресс рассматривается в качестве одного из возможных механизмов развития осложнений. Однако маркеры окислительного стресса нейтрофилов при алкогольной нефропатии мало изучены. Следует отметить, что практически не изучен такой важный аспект окислительного стресса, как окислительная модификация белков при экзогенных токсических нефропатиях. Существующие медицинские исследования главным образом сфокусированы на механизмах хронического злоупотребления алкоголем или *in vitro* исследованиях, изучающих влияние этанола. Стоит обратить внимание, что изучению нейтрофилов уделяется огромное внимание, когда речь идет о воспалительных заболеваниях, поскольку роль нейтрофилов в воспалении неоспорима. Тем не менее, на наш взгляд, не стоит недооценивать роли нейтрофилов в патогенезе токсических нефропатий, как клеток, способных вызывать деструкцию тканей. Ряд исследований демонстрируют инфильтрацию почечной ткани нейтрофилами при токсическом поражении почек, подобной той, что наблюдается при гломерулонефрите. Значение этого явления широко обсуждается. С одной стороны, это может носить защитный характер благодаря способности нейтрофилов

нейтрализовать продукты клеточной гибели, а с другой - вносить вклад в деструкцию почечной ткани [5] за счет секреции АФК и ряда медиаторов. Одним из таких медиаторов является фактор активации тромбоцитов (РАF), рассматриваемый как участник в развитии острой почечной дисфункции и прогрессировании ОПН [6]. Таким образом, вопрос о роли нейтрофилов в патогенезе нефропатии у людей с отравлениями алкоголем остается открытым.

Целью нашей работы было изучение маркеров окислительного стресса нейтрофилов у пациентов с токсическими нефропатиями, вызванными острым отравлением алкоголем и уксусной кислотой.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось с декабря 2017 года по июль 2018 года на базе лаборатории кафедры биохимии совместно с токсикологическим отделением областного медицинского центра г. Караганды, где осуществлялась диагностика, подбор пациентов и забор крови. Верификация диагноза была основана на истории болезни и результатах объективного обследования. Диагностика отравлений этанолом и определение степени тяжести интоксикации проводилась на основе протокола «Токсическое действие алкоголя (взрослые и дети)», рекомендованного Экспертным советом Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан от 30 октября 2015 г. Отравления уксусной кислотой устанавливались на основании протокола диагностики «Токсическое действие разъедающих веществ (взрослые и дети)» (от 30 октября 2015 г., протокол № 14). Токсическое поражение почек устанавливали на основании комплексной оценки основных клинических и лабораторных показателей функционального состояния почек. Основными клиническими и лабораторными признаками нефропатии считались снижение суточного диуреза, появление мочевого синдрома с протеинурией, гематурией, лейкоцитурией, повышение креатинина и мочевины крови, электролитные сдвиги, снижение скорости клубочковой фильтрации. До начала исследования было получено информированное согласие от больных и здоровых лиц для участия в исследовании, само исследование было одобрено Комитетом по этике. Исследовались нейтрофилы крови 30 больных нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем (1 группа), 20 пациентов с нефропатией, вызванной острым отравлением уксусной кислотой (2 группа) и 25 здоровых доноров (контрольная группа). Возрастной диапазон участников исследования от 20 до 50 лет. Во всех исследуемых группах преобладали мужчины. В исследовании учитывалось влияние степени тяжести отравления алкоголем (средняя степень, n=18; тяжелая степень, n=12) на изучаемые показатели нейтрофилов. Забор крови осуществлялся рано утром, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Для выделения нейтрофилов и приготовления лизата использовали метод Федоровой М.З. и Левина В.Н. [7].

Стандартизовали количество клеток до 1 млн в 1 мл среды. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5% трипановым синим составляла не менее 80%.

В качестве маркеров окислительного стресса нейтрофилов оценивалась активность ферментов каталазы и миелопероксидазы (МПО) [8], а также содержание окисленно-модифицированных белков: карбонильных производных (КП) и продуктов глубокого окисления белков (advanced oxidative protein products, AOPP). Активность МПО в нейтрофилах оценивали по способности фермента катализировать окисление индигокармина пероксидом водорода. Все данные были получены спектрофотометрически. Уровень карбонильных производных белков определяли по методу, предложенному Levine R.L. [9]. Содержание AOPP определяли, используя метод, предложенный Witko-Sarsat [10]. Различия в исследуемых группах оценивали с помощью рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса и считали достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ . Для анализа полученных данных использовалась программа Statistica 7.0. Критериями исключения пациентов из исследования были острые или хронические пиелонефриты инфекционной этиологии, острые или хронические гломерулонефриты, нефропатия беременных, а также возраст обследуемых моложе 18 или старше 50 лет.

**Результаты исследования и обсуждение.** При исследовании маркеров окислительного стресса нейтрофилов в группе пациентов с нефропатией, вызванной острым отравлением уксусной кислотой, выявлена тенденция к снижению уровня AOPP и КП белков нейтрофилов относительно значений контрольной группы на 74% и 78% соответственно (табл. 1). При этом в данной группе статистически значимого изменения активности ферментов нейтрофилов не выявлено. Стоит отметить, что совершенно противоположный тренд в содержании окисленно-модифицированных белков мы наблюдали в эритроцитах крови пациентов с нефропатией, вызванной острым отравлением уксусной кислотой [11].

Таблица 1

Данные описательной статистики по уровню AOPP нейтрофилов в исследуемых группах

Показатель	Группы			
	Контроль (n=25)	Отравление уксусной кислотой (n=20)	Отравление этанолом средней степени (n=18)	Отравление этанолом тяжелой степени (n=12)
Медиана	0,061	0,045	0,062	0,060
Нижний квартиль	0,048	0,036	0,039	0,047
Верхний квартиль	0,072	0,056	0,079	0,090

В группе больных нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем, мы наблюдали разнонаправленные изменения в содержании КП белков нейтрофилов, обусловленные степенью тяжести отравления. Мы выяснили, что максимальное снижение уровня КП наблюдалось у пациентов со средней степенью тяжести отравления алкоголем (табл. 2) и достоверно отличалось не только от контрольной группы ( $p=0,005$ ), но и от значений в группе пациентов с тяжелой степенью отравления ( $p=0,0086$ ). Относительно другого типа окисленных белков – АОРР, в данной группе статистически значимого влияния степени тяжести отравления не установлено (табл. 1).

Таблица 2

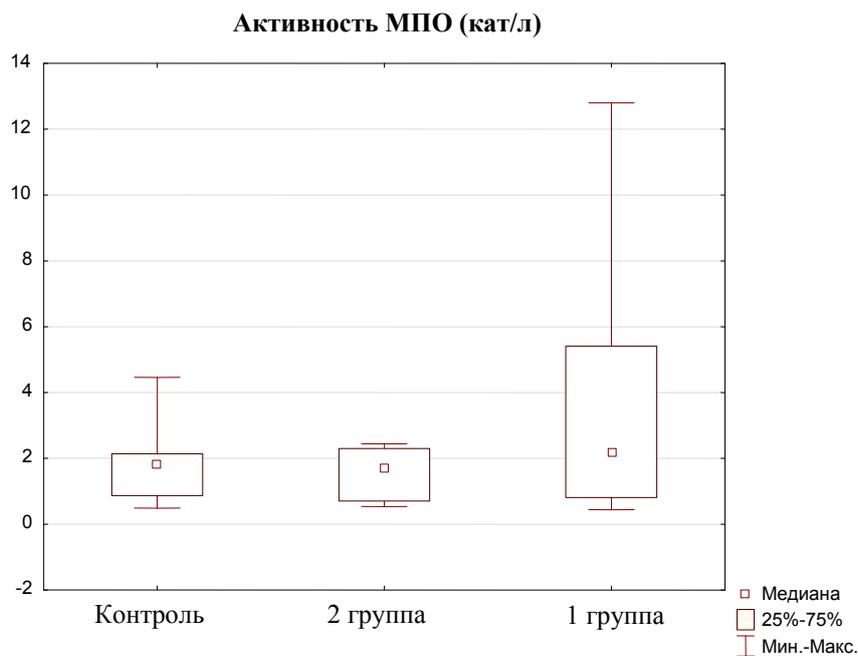
Данные описательной статистики по уровню КП белков нейтрофилов в исследуемых группах

Показатель	Группы			
	Контроль (n=25)	Отравление уксусной кислотой (n=20)	Отравление этанолом средней степени (n=18)	Отравление этанолом тяжелой степени (n=12)
Медиана	0,329	0,255	0,190*	0,355 <sup>§</sup>
Нижний квартиль	0,277	0,208	0,182*	0,329 <sup>§</sup>
Верхний квартиль	0,442	0,286	0,216*	0,381 <sup>§</sup>

Примечание: \* - достоверность отличий от контрольной группы,  $p=0,005$ ;

<sup>§</sup> - достоверность отличий от группы с тяжелой степенью отравления,  $p=0,009$ .

У больных нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем (1 группа), выявлена тенденция к повышению активности МПО нейтрофилов относительно контроля, без статистически значимого влияния степени тяжести отравления (рис.). Активность каталазы в данной группе имела тенденцию к увеличению при средней степени тяжести отравления со статистически значимым ее повышением при тяжелой степени отравления относительно значений контрольной группы ( $p=0,044$ ) (табл. 3).



*Активность МПО нейтрофилов в исследуемых группах:*

*1 группа – пациенты с нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем;*

*2 группа – пациенты с нефропатией, вызванной острым отравлением уксусной кислотой*

Таблица 3

Данные описательной статистики по активности каталазы нейтрофилов в исследуемых группах

Показатель	Группы			
	Контроль (n=25)	Отравление уксусной кислотой (n=20)	Отравление этанолом средней степени (n=18)	Отравление этанолом тяжелой степени (n=12)
Медиана	0,0011	0,0011	0,0013	0,0018*
Нижний квартиль	0,0010	0,0010	0,0011	0,0015*
Верхний квартиль	0,0015	0,0067	0,0055	0,0020*

Примечание: \* - достоверность отличий от контрольной группы,  $p=0,044$ .

Таким образом, в группе пациентов с нефропатией, вызванной острым отравлением уксусной кислотой, мы выявили четкую тенденцию к снижению уровня окисленных белков в нейтрофилах, при этом активность ферментов МПО и каталазы оставались в пределах

нормы. Однако у 5 пациентов в группе наблюдалось повышение активности каталазы почти в 2 раза, вероятно, данный факт, обусловлен степенью тяжести отравления уксусной кислотой, что в нашем исследовании не учитывалось. Снижение уровня окисленных белков может быть результатом активации каталазы как компенсаторного механизма. В группе больных нефропатией, вызванной острым отравлением алкоголем, мы выяснили, что активность каталазы, а также содержание КП зависят от степени тяжести отравления. Так, у пациентов со средней степенью тяжести мы наблюдали интересный тренд: статистически значимое снижение уровня КП с тенденцией к повышению активности каталазы и МПО, в то время как у пациентов с тяжелой степенью отравления мы наблюдали практически нормальный уровень КП со статистически значимым повышением активности каталазы и возрастанием активности МПО. Процесс карбонилирования белков является индикатором продукции свободных радикалов и используется как маркер окислительного повреждения белков. Безусловно, повышение активности каталазы является компенсаторным механизмом не только ввиду антиоксидантного действия фермента, но и благодаря его способности окислять низкомолекулярные спирты в присутствии пероксида водорода. Вероятно, подобным образом нейтрофилы повышают не только свою защиту, но и помогают утилизировать избыток этанола в организме, предупреждая его прямое токсическое действие, то есть наблюдалась активация детоксикационной функции нейтрофилов.

Тяжесть острого отравления алкоголем определяется мембранотропным действием этилового спирта, эффектами токсичных продуктов, образующихся в процессе метаболизма этанола, развитием ацидоза и усилением процессов перекисного окисления липидов мембран клеток. В условиях прямого мембранотоксического действия этанола и уксусной кислоты, избыточной генерации активных форм кислорода (АФК) и присутствующих в той или иной степени гемолиза эритроцитов и гипоксии, нейтрофилы должны обладать особыми механизмами защиты от окисления их мембранных липидов и разрушения клетки, поскольку данный факт приведет к высвобождению дополнительных прооксидантов в кровь и усугублению последствий отравления. На наш взгляд, зафиксированный нами тренд снижения уровня КП белков в нейтрофилах обусловлен эффективным поглощением нейтрофилами антиоксидантов и активацией антиоксидантных ферментов, в частности супероксиддисмутазы, ключевого ферменты обрыва цепи свободнорадикальных реакций. На снижение прооксидантного потенциала нейтрофилов указывает также и отсутствие повышения активности МПО у пациентов с отравлением уксусной кислотой, что, несомненно, носит компенсаторный характер, обеспечивая защиту организма от выброса дополнительного количества АФК при разрушении нейтрофилов.

**Заключение.** Таким образом, нами были выявлены различные тенденции и

разнонаправленные изменения маркеров окислительного стресса нейтрофилов у больных с токсическими нефропатиями, обусловленные в том числе степенью тяжести отравления.

### Список литературы

1. Бабанин А. А., Беловицкий О. В., Скребкова О. Ю. Современные представления о повреждениях почек в условиях алкогольной интоксикации // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2011. № 1. С.3-4.
2. Краева Ю.В., Брусин К.М., Кондрашов Д.Л., Сенцов В.Г., Ховда К.Е. Исследование структуры острых отравлений на догоспитальном и госпитальном этапах // Фундаментальные исследования. 2013. Т. 14. С.750-761.
3. Ягудина Р., И., Куликов А.Ю., Арина Е.Е., Усенко К.Ю. Фармакоэкономика алкоголизма. М.: Монография, 2010. 184 с.
4. Sonmez M., Ince H., Yalcin O., Ajdžanović V., Spasojević I. The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size. PLoS One. 2013. vol. 8. no. 9. e76579.
5. Chibishev A., Sikole A., Pereska Z., Chibisheva V., Simonovska N., Orovchanec N. Severe renal function impairment in adult patients acutely poisoned with concentrated acetic acid. Arh. Hig. Rada Toksikol. 2013. vol. 64. no. 1. P. 153-158.
6. Correa-Costa M., Andrade-Oliveira V., Braga T.T., Castoldi A., Aguiar C.F., Origassa C.S., Rodas A.C., Hiyane M.I., Malheiros D.M., Rios F.J., Jancar S., Camara N.O. Activation of platelet-activating factor receptor exacerbates renal inflammation and promotes fibrosis. Lab Invest. 2014. vol. 94. no. 4. P. 455-466.
7. Федорова М.З., Левин В.Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // Клиническая медицина. 2000. № 8. С.35-38.
8. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Изд-во РАМН, 2009. 203 с.
9. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Method Enzymol. 1990. vol. 186. P. 464-478.
10. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillère-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen A.T., Zingraff J., Jungers P. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int. 1996. vol. 49. no. 5. P. 1304-1313.
11. Demidchik L.A., Beynikova I.V., Muravleva L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Bakirova

R.E., Klyuev D.A. Oxidized proteins in the blood of patients with acute acetic acid intoxication. International journal of applied and fundamental research. 2018. no.5. C.82-86.