

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Самохина Л.М.

Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой
Национальной академии медицинских наук Украины

Развитие хронической болезни почек (ХБП) связано с деструктивными процессами, которые происходят с участием эластаз различного происхождения. Их активность в организме регулируется с помощью α -1-ингибитора протеиназ (α -1-ИП). В данной работе исследовали общую активность эластаз (ОАЭ), активность металлоэластазы (МЭл), эндотелиальной эластазы (ЭЭл) и эластазоингибиторную активность (ЭИА) α -1-ИП в сыворотке крови до лечения у больных с различной выраженностью ХБП. Выявлено снижение ОАЭ, активности МЭл и ЭЭл на фоне повышения ЭИА α -1-ИП, при этом существенное снижение ОАЭ и ЭЭл в моче указывает на истощение возможности участия нейтрофилов и эндотелиоцитов в процессе патогенетических изменений в почках, а отсутствие снижения активности МЭл – на проявление активности макрофагов. Нефропротекторная терапия приводила к коррекции изменений в системе эластаза- α -1-ИП.

Ключевые слова: эластаза, металлоэластаза, эндотелиальная эластаза, эластазоингибиторная активность α -1-ингибитора протеиназ, хроническая болезнь почек, диабетическая нефропатия, хронический гломерулонефрит.

Постановка проблемы. В ходе эволюции ХБП и снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ) в организме больного формируется ряд биохимических сдвигов, которые практически полностью совпадают с так называемыми неклассическими или нетрадиционными факторами риска сердечнососудистых заболеваний [5, с. 7]. Почка активно включается в цепь патогенетических событий (атерогенез, ремоделирование и др.). С развитием атеросклероза, артериальной гипертензии и ее осложнений напрямую или косвенно связана каждая из функций эндотелия, определяющая тромбогенность сосудистой стенки, воспалительные изменения, вазореактивность и стабильность атеросклеротической бляшки [2, с. 28]. Дисфункция эндотелия (ДЭ) может быть фактором, влияющим на ремоделирование сердца и артерий в развитии и прогрессировании ХБП. При этом у больных имеются значимые корреляции между воспалением, ДЭ и повышенным оксидативным стрессом (ОКСТР). Снижение СКФ способствует накоплению прооксидантов, которые наносят ущерб всему организму [12, с. 202]. Цепь нарушений, связанных с ОКСТР, наиболее ярко прослеживается при прогрессировании хронического гломерулонефрита (ХГН) [6, с. 42]. На фоне ХГН мембранные образования клубочка подвергаются повреждающему воздействию иммунных комплексов и антител к базальной мембране при участии активированной системы компонента, макрофагов, нейтрофилов и мезангиальных клеток. Клетки начинают интенсивно набирать активные формы кислорода, происходит стимуляция перекисного окисления липидов, экзогенных фосфолипаз и протеаз. Среди протеаз следует выделить эластазы, которые могут высвобождаться макрофагами (металлоэластаза), нейтрофилами (сериновая эластаза) и эндотелиоцитами (тиоловая или цистеиновая эластаза). Активация эластаз может быть обусловлена развитием ОКСТР, приводить к морфофункциональным нарушениям структуры тканей органов и характера протекающих метаболических процессов [3, с. 47, 10, с. 15]. С мембранодеструктивными процессами часто связано и течение ХБП, когда наблюдают значительные изменения структурно-функциональной организации почечных мембран [6, с. 42]. Регуляция активности эластаз в организме осуществляется с участием α -1-ИП. Повышению ЭИА α -1-ИП может способствовать лечение ингибиторами ангиотензин-

превращающего энзима (иАПЭ) или антагонистами рецепторов ангиотензина II (АРАП) [4, с. 69].

Анализ последних исследований и публикаций. Патогенез ХБП рассматривают как разрушение почечной паренхимы вследствие рубцевания (фиброз) [11, с. 2]. Ключевыми в развитии патологии являются интерстициальный воспалительный ответ, появление миофибробластов, в первую очередь, из стромальных клеток почек (фибробластов и перицитов), являющихся источником различных протеинов внеклеточного матрикса. Кроме того, потеря интерстициальной целостности ставит под угрозу доставку кислорода, др. При отсутствии адекватных ответов кровеносных сосудов интерстициальная капиллярная сеть не функционирует на должном уровне, с течением времени происходит изменение состава и структуры многофункциональных макромолекул, снижение их содержания с помощью внеклеточных и внутриклеточных протеаз. При этом ишемическое, токсическое поражение может вызывать увеличение в почках в 5-10 раз содержания мРНК и протеина α -1-ИП параллельно с экскрецией (> 100 раз) данного ингибитора с мочой, снижается содержание нейтрофильной эластазы, что отражает результат ее комплексообразования с α -1-ИП [13, с. 98380].

Выделение нерешенных ранее частей общей проблемы. Особое внимание уделено необходимости мониторинга показателей, связанных с развитием ОКСТР, у пациентов с ХБП [12, с. 202]. Необходимо понимание патогенеза фиброза почек [11, с. 2]. Правильная интерпретация отношений между этими маркерами и функцией почек может способствовать эффективному лечению больных [11, с. 2, 12, с. 202, 13, с. 98380].

Цель статьи. Главной целью этой работы является изучить активность эластаз и ЭИА α -1-ИП в сыворотке крови и моче больных с различной выраженностью ХБП на фоне традиционной нефропротекторной терапии.

Изложение основного материала. Обследована группа пациентов с ХБП, которая представлена диабетической нефропатией (ДН) I-II ст. (согласно С.Е. Mogensen, 1983) и сахарным диабетом II типа с признаками ишемической болезни сердца при отсутствии микроальбуминурии (МАУ) и с нормальным значением СКФ ($n=16$), и ХГН ($n=8$). Диагностировали ХБП сотрудники отдела нефрологии ГУ «Национальный институт терапии им. Л.Т. Малой НАМНУ» согласно классификации, разработанной

II национальным съездом нефрологов Украины, стадию заболевания определяли с учетом показателей функций почек, СКФ по формуле Кокрофта. Терапия: АРАП – лосартан калия в дозе от 50 мг до 100 мг в сутки или иАПЭ – периндоприл в дозе от 5 мг до 10 мг в сутки или квинаприл в дозе 10 мг или 20 мг в сутки в зависимости от уровня артериального давления. Контрольная группа – 14 здоровых лиц.

В суточной моче определяли уровень экскреции альбумина иммуноэнзимным методом с использованием стандартизированных тест-систем «Альбумин – ИФА» (Украина). Об отсутствии МАУ свидетельствовали, если уровень экскреции альбумина менее 30-300 мг/сутки или 20-200 мкг/мин. У больных с отсутствием МАУ в сыворотке крови и моче исследовали активность эластаз и ЭИА α-1-ИП высокочувствительным энзиматическим методом [8, с. 1, 10, с. 45]. В качестве контроля использовали растворы эластазы 0,0005-0,5 Ед./мг протеинов. Для определения активности МЭл перед протеолитической реакцией подавляли сериновые и тиоловое эластазы добавлением к опытным образцам (2:1 по объему) 0,04% ФСФ и 0,1% моноиодацетата, инкубировали 5 мин при 37 °С. Для определения ЭИА α-1-ИП сначала к исследуемым образцам добавляли избыток эластазы 1:1 (раствор активностью 0,5 Ед./мг протеинов) для связывания с ингибитором, инкубировали 15 мин при 20°С. Концентрацию протеинов определяли методом Бредфорда. В исследованиях использовали пероксидазу хрена, ФСФ, моноиодацетат фирмы «ICN» (США), Ala-Ala фирмы Fluka (Германия), эластазу, ЭДТА, полистироловые планшеты (Россия) и фотометр-анализатор иммуноферментный Humanreader № 2106-1709 фирмы «Human» (Германия). Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера с использованием программного обеспечения Mikrosoft Office Excel.

В результате отмечено снижение по сравнению с контролем ОАЭ, активности МЭл и ЭЭл в сыворотке крови до и после лечения (Табл. 1). В моче

выявлен существенный характер снижения ОАЭ по сравнению с контролем в обеих группах больных до и после лечения, активности МЭл при ХГН после лечения, ЭЭл – кроме ХГН после лечения (Табл. 2). Снижение ОАЭ и ЭЭл в сыворотке крови и моче до лечения указывает на истощение возможности участия нейтрофилов и эндотелиоцитов в процессах патогенетических изменений в почках, а отсутствие существенного снижения в моче активности МЭл – на участие макрофагов в обеспечении активности эластаз.

В результате лечения выявлены обратно направленные тенденции изменений активности ЭЭл у больных ХГН и ДН в сыворотке крови: снижение у больных ХГН, а при ДН – наоборот, повышение. В моче указанные тенденции имели обратный характер: при ХГН – повышение, а при ДН – снижение.

Исследование ЭИА α-1-ИП позволило выявить в сыворотке крови более высокий ее уровень по сравнению с контролем до лечения при отсутствии изменений в моче у всех пациентов ХБП. После лечения ЭИА в сыворотке крови снижалась, более существенно при ХГН. В моче изменения ЭИА носили характер тенденции: при ХГН отмечено снижение, а при ДН – повышение. Учитывая снижение ЭИА α-1-ИП в моче при ХГН на фоне лечения, тенденция к повышению активности ЭЭл может предполагать развитие деструктивных процессов в почках на фоне более тяжелого течения патологического процесса.

Низкая активность эластазы, МЭл при ХБП связана, скорее всего, с вкладом ОКСТР на стадии предпатологии, когда ОАЭ значительно повышается [3, с. 51]. Снижение активности эластаз связывают с их расходом в процессах деградации экстацеллюлярного матрикса и отсутствием их синтеза и высвобождения. Учитывая, что на фоне ХГН мембранные образования клубочка подвергаются повреждающему воздействию макрофагов, нейтрофилов, осуществляемых с участием протеаз [6, с. 42], можно свидетельствовать о наличии вклада соответствующих эластаз в этот процесс при прогрессировании ХБП.

Таблица 1

Активность эластаз и эластазоингибиторная активность α-1-ингибитора протеиназа в сыворотке крови при хронической болезни почек

Исследуемые группы	n	до/после	Общая активность эластазы, Ед./мг протеинов	Активность металло-эластазы, Ед./мг протеинов	Активность эндотелиальной эластазы, Ед./мг протеинов	Эластазо-ингибиторная активность α-1-ингибитора протеиназа, Ед./мг протеинов
Контроль	14		2,982±1,004	3,695±1,037	16,768±2,537	231,5±0,9
ХГН	8	до	0,011±0,001*	0,350±0,090*	0,082±0,027*	237,5±2,5*
		после	0,012±0,004*	0,887±0,240*	0,053±0,013**	226,2±1,2**#
ДН	16	до	0,014±0,001*	0,585±0,109*	0,087±0,013*	237,8±2,0*
		после	0,018±0,003*	0,737±0,096*	0,107±0,010**	227,5±6,1

Примечания здесь и далее: 1) *, **, *** – степень вероятности различий по сравнению с контролем $p < 0,05; 0,01; 0,001$; соответственно, 2) # – степень вероятности различий по сравнению с группой до лечения $p < 0,05$.

Таблица 2

Активность эластаз и эластазоингибиторная активность α-1-ингибитора протеиназа в моче при хронической болезни почек

Исследуемые группы	n	до/после	Активность эластазы, Ед./мг протеинов	Активность металло-эластазы, Ед./мг протеинов	Активность эндотелиальной эластазы, Ед./мг протеинов	Эластазо-ингибиторная активность α-1-ингибитора протеиназа, Ед./мг протеинов
Контроль	8		0,0006±0,0002	0,0042±0,0013	0,007±0,001	0,979±0,008
ХГН	8	до	0,00011±0,00001*	0,0032±0,0010	0,00054±0,00009**	0,979±0,019
		после	0,00008±0,00003*	0,00078±0,00022*	0,0018±0,0006	0,962±0,031
ДН	16	до	0,00011±0,00002*	0,0020±0,0003	0,00044±0,00011***	0,982±0,006
		после	0,00009±0,00001*	0,0017±0,0002	0,00028±0,00007***	1,162±0,163

Существенный характер изменений активности ЭЭл указывает на значимый вклад эндотелиоцитов в развитие патогенетических изменений. Так адгезивная форма ДЭ обусловлена нарушением взаимодействия лейкоцитов и эндотелия [7, с. 24]. Повышение адгезивности эндотелия и неконтролируемая адгезия лейкоцитов имеют большое значение в патогенезе воспаления при атеросклерозе и др. Уникальное положение клеток эндотелия на границе между циркулирующей кровью и тканями делает их более уязвимыми для различных патогенных факторов, находящихся в системном и тканевом кровотоке. Именно эти клетки первыми встречаются с реактивными свободными радикалами, высоким гидростатическим давлением внутри выстилаемых ими сосудов и другими факторами, что приводит к повреждению сосудов, их дисфункции как эндокринного органа и ускоренному развитию ангиопатий и атеросклероза. ДЭ связывают с дисбалансом между продукцией вазодилаторов и вазоконстрикторов, тромбогенных и атромбогенных факторов, ангиогенных факторов и их ингибиторов, и выделяют, кроме адгезивной, вазомоторную, тромбофилическую и ангиогенную ее формы. В нашем исследовании следует обратить внимание на тромбофилическую форму ДЭ, которая обусловлена нарушением нормального соотношения веществ, образующихся в эндотелии, в том числе ЭЭл. Можно предполагать возможность участия ЭЭл в процессах увеличения проницаемости эндотелия и разрушения базальной мембраны. При ОКСТР накапливаются продукты перекисного окисления липидов и окисления протеинов, усиливается гемолиз эритроцитов, т.к. окисление протеинов мембран уменьшает ее эластичность и выживаемость эритроцитов в кровяном русле [6, с. 42]. Указанные изменения приводят к большей выраженности ДЭ и атеросклеротических поражений и, как результат, к развитию осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. Уменьшение эластичности мембран может быть связано со снижением активности ЭЭл. Это обусловлено тем, что важными характеристиками сосудов является растяжимость или податливость, т.е. способность к изменениям объема под воздействием колебания давления [9, с. 59]. Снижение активности ЭЭл может быть непосредственно связано с развитием структурных изменений сосудов, уменьшением эластичности волокон, обеспечивающих противодействие их растянутости, т.е. сосуды становятся более ригидными. Кроме того, способность сосудов к сопротивлению деформации, в том числе растяжимости, определяет жесткость. Можно предположить изменения жесткости сосудов у обследованных больных. При ХБП наблюдаются системные нарушения вазодилаторных реакций [2, с. 28]. Недостаточная вазодилатация может способствовать сосудистым нарушениям при ХБП, возникающим задолго до появления клинической симптоматики сердечнососудистых расстройств. При этом интересно отметить наличие корреляций данных относительно ЭЭл с таковыми у детей [1, с. 113].

Снижение на фоне лечения активности ЭЭл в сыворотке крови больных ХГН и ее повышение в моче может указывать на возможность коррекции деструктивных процессов в почках. Кроме того, при нефротической форме ХГН обычно обнаружи-

вают мембранозный и мезангиопролиферативный морфологические варианты. Для мембранозного характерны наличие субэпителиальных депозитов и утолщение гломерулярной базальной мембраны, для мезангиопролиферативного – пролиферация мезангиальных клеток и матрикса. Отмеченный баланс активности ЭЭл в сыворотке крови и моче на фоне терапии указывает на ее активную циркуляцию через почки, что может приводить к расщеплению гломерулярных утолщений, субэпителиальных депозитов, проявлению положительного эффекта терапии.

Низкая активность эластаз в сыворотке крови непосредственно связана с высокой ЭИА α -1-ИП. Последнее характеризует наличие воспалительного процесса, при этом повышение ЭИА указывает и на снижение окисления Met активного центра α -1-ИП. Учитывая малую вероятность снижения проявлений ОКСТР, образования окислительных метаболитов, способных влиять на ЭИА у данных больных, можно предполагать, что повышение ЭИА обусловлено увеличением содержания α -1-ИП, т.е. его синтеза и/или высвобождения. Повышение ЭИА в сыворотке крови при отсутствии изменений в моче может свидетельствовать об участии данного ингибитора в подавлении избыточной активности протеиназ, в частности эластаз, в кровотоке.

Нефропротекторная терапия ХБП способствовала коррекции изменений в системе эластаза- α -1-ингибитор протеиназ в сыворотке крови за счет снижения ЭИА, больше у больных ХГН. Отмеченная тенденция к повышению ЭИА в моче у больных с ДН на фоне терапии, в отличие от больных с ХГН, указывает на увеличение содержания и/или активности данного ингибитора и проявление локальной защищенности данного органа от повреждений с участием эластаз.

Выводы и предложения. При ХБП ОАЭ, активность МЭл и ЭЭл снижается на фоне повышения ЭИА α -1-ИП в сыворотке крови, что указывает на расходование нейтрофильной эластазы и МЭл в процессах деградации экстрацеллюлярного матрикса, отсутствие их синтеза и высвобождения, и возможное участие ЭЭл в процессах увеличения проницаемости эндотелия и разрушения базальных мембран. Снижение ОАЭ и ЭЭл в моче указывает на исчерпывание возможности участия нейтрофилов и эндотелиоцитов в патогенетических изменениях в почках, а отсутствие снижения активности МЭл – на проявление активности макрофагов. Нефропротекторная терапия с использованием АРАП или иАПЭ способствует коррекции изменений в системе эластаза- α -1-ИП за счет снижения ЭИА в сыворотке крови у всех больных ХБП, повышения и нормализации активности ЭЭл в моче при ХГН.

Правильная интерпретация отношений эластаза/ α -1-ИП при ХБП может способствовать более эффективному лечению и оздоровлению больных. Перспективным может быть исследование отношений эластаза/ α -1-ИП при кардиоренальном синдроме, лежащем в основе высоких темпов заболеваемости и смертности, развивающихся с прогрессированием фиброза почек.

Автор благодарит д.м.н., профессора Топчия И.И., д.м.н. Несена А.А. за организацию набора биоматериала и клинической характеристики больных.

Список литературы:

1. Макеева Н. И. Роль эластаз в формировании хронического заболевания почек у детей / Макеева Н. И., Сенаторова Г. С., Самохина Л. М. // Медицина сегодня и завтра. – 2009. – № 1. – С. 113-117.
2. Особенности функции эндотелия при хронической болезни почек. Обзор литературы и собственные данные / Панина И. Ю., Румянцев А. Ш., Меншутина М. А. [и др.] // Нефрология. – 2007. – Т. 11, № 4. – С. 28-46.
3. Самохина Л. М. Химаза, тонин и эластаза у крыс при окислительном стрессе, вызванном введением хлорида кобальта / Самохина Л. М., Самохин А. А. // Укр. биох. журн. – 2001. – Т. 73, № 5. – С. 47-51.
4. Система протеиназа-ингибитор протеиназ у пациентов с хронической болезнью почек в динамике нефропротекторной терапии / Топчий И. И., Самохина Л. М., Несен А. О., Дерев'яченко Л. И. // Укр. терапевт. журн. – 2008. – № 4. – С. 69-73.
5. Смирнова А. В. Концепция факторов риска в нефрологии: Вопросы профилактики и лечения ХБП / Смирнова А. В., Каюков И. Г., Добронравов В. А. // Нефрология. – 2008. – Т. 12, № 1. – С. 7-13.
6. Тугушева Ф. А. Оксидативный стресс и его участие в неиммунных механизмах прогрессирования хронической болезни почек / Тугушева Ф. А., Зубина И. М. // Нефрология. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 42-48.
7. Шишкин А. Н. Эндотелиальная дисфункция, метаболический синдром и микроальбуминурия / Шишкин А. Н., Лындина М. Л. // Нефрология. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 24-38.
8. Пат. 45068 Україна G 01 N 33/48, A 61 B 19/02. Набір для визначення активності ендотеліальної еластази в біологічних рідинах / Самохіна Л. М., Максимова Н. А.; заявник і патентовласник: Харків, Інститут терапії АМН України. – № 2001042735; заявл. 23.04.2001; опубл. 15.03.2002; Бюл. № 3. – 6 с.
9. Растяжимость аорты при артериальной гипертензии / Мартынов А. И., Остроумова О. Д., Сеницын В. Е. [и др.] // Кардиология. – 2001. – № 2. – С. 59-65.
10. Самохина Л. М. Энзимы вазоконстрикции и деструкции. Влияние тяжелых металлов / Самохина Л. М. – LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrücken, Deutschland, Германия. – 2014. – ISBN: 978-3-659-63483-3. – 80 с.
11. Eddy A. A. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis / Eddy A. A. // Kidney Int. Suppl. – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 2-8.
12. [Oxidative stress in kidney disease patients] / Vostálová J., Galandáková A., Strelb P. [et al.] // Vnitr. Lek. – 2012. – Vol. 58, № 3. – P. 202-207.
13. Zager R. A. Rapid renal alpha-1 antitrypsin gene induction in experimental and clinical acute kidney injury / Zager R. A., Johnson A. C., Frostad K. B. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. e98380.

Самохіна Л.М.

Національний інститут терапії імені Л.Т. Малої
Національної академії медичних наук України

ДЕЯКІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ ДЕСТРУКТИВНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ПАТОЛОГІЇ**Анотація**

Розвиток хронічної хвороби нирок (ХХН) пов'язані з деструктивними процесами, які відбуваються за участю еластаз різного походження. Їх активність в організмі регулюється за допомогою α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІІІ). У даній роботі досліджували загальну активність еластаз (ЗАЕ), активність металоеластази (МЕЛ), ендотеліальної еластази (ЕЕЛ) і еластазоінгібіторну активність (ЕІА) α -1-ІІІ у сироватці крові до лікування у хворих з різною виразністю ХХН. Виявлено зниження ЗАЕ, активності МЕЛ і ЕЕЛ на тлі підвищення ЕІА α -1-ІІІ, при цьому суттєвий характер зниження ЗАЕ і ЕЕЛ в сечі у пацієнтів з ХХН вказує на вичерпування можливості участі нейтрофілів і ендотеліоцитів у процесі патогенетичних змін в нирках, а відсутність зниження активності МЕЛ – на прояв активності макрофагів. Нефропротекторна терапія сприяла корекції змін в системі еластаза- α -1-ІІІ.

Ключові слова: еластаза, металоеластаза, ендотеліальна еластаза, еластазоінгібіторна активність α -1-інгібітора протеїназ, хронічна хвороба нирок, діабетична нефропатія, хронічний гломерулонефрит.

Samokhina L.M.

National Institute of Therapy of L.T. Malaya name of
National Academy of Medical Sciences of Ukraine

SOME ASPECTS OF DESTRUCTIVE PROCESSES IN PATHOLOGY**Summary**

The development of chronic kidney disease (CKD) is associated with destructive processes that take place with the participation of elastases of different origin. Its activities are regulated in the body with α -1-proteinase inhibitor (α -1-PI). The total activity of elastases (TAE), the activities of metalloelastase (MEL), endothelial elastase (EEL) and elastase inhibitory activity (EIA) of α -1-PI in serum before treatment in patients with varying severity of CKD were investigated in this study. The reduction in the TAE, MEL and EEL activities against a background and increasing EIA α -1-PI were revealed, at the same time the essential character of the TAE and EEL reduction in the urine indicates the exhaustion of opportunities for participation of neutrophils and endothelial cells in the process of pathogenetic changes in the kidneys and the absence of reducing of MEL activity indicates the manifestation of the macrophages activities. Nephroprotective therapy helps to correct changes in the elastase- α -1-PI system.

Keywords: elastase, metalloelastase, endothelial elastase, elastase inhibitory activity of α -1-proteinase inhibitor, chronic kidney disease, diabetic nephropathy, chronic glomerulonephritis.