

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ  
УДК 612.46+612.463+612.467+612.115.1

## АКТИВАТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ ФИБРИНОЛИЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ И АМИЛОИДОЗЕ

Л.В.ПОДОРОВСКАЯ, Г.В.АНДРЕЕЕНКО, Л.Р.ПОЛЯНЦЕВА, И.Д.БУМБЛИТЕ

МГУ им. М.В.Ломоносова, 119899 Москва, Воробьевы горы, МГУ. Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова. 119021, Москва, Большая Пироговская ул., 2/6

У 31 больного хроническим гломерулонефритом, 23 больных амилоидозом и 15 здоровых лиц, определяя функциональную активность активаторов плазминогена (ФААП) и их ингибиторов, содержание антигенов активаторов плазминогена (АП) методом ELISA, выявили корреляцию высокой ФААП, ассоциирующей с благоприятным течением заболеваний и высокого содержания антигенов АП, сниженного уровня  $\alpha_2$ -антитрипсина,  $\alpha_2$ -макроглобулина и антиактиваторов. При нулевой ФААП уменьшен уровень антигенов АП и увеличена активность ингибиторов. Белковая нагрузочная проба демонстрировала резервы АП в группе с повышенной ФААП и "патологический протеолиз" с нулевой ФААП, обусловленный, вероятно, неспецифическими протеазами, отличными от АП.

**Ключевые слова:** хронический гломерулонефрит, амилоидоз, регуляторы ограниченного протеолиза.

**Введение.** Нефротическому синдрому (НС) с присущим ему повреждением эндотелия сосудов иммунными комплексами свойственна активизация систем ограниченного протеолиза: калликреин-кининовой [1], системы компонентов комплемента [2], гемостаза [3], Хагеман-зависимого фибринолиза [1]. Образующиеся в результате сериновые протеазы, обладающие широким спектром действия, способны гидролизовать многие природные субстраты: фибриноген, фибрин, эластин, коллаген, протеогликаны, компоненты эндоплазматического ретикулаума [4]. Основными регуляторами процессов ограниченного протеолиза являются ингибиторы сериновых протеаз, которые представляют собой белки, имеющие невысокую специфичность, составляющие большое семейство серпинов: С1-эстеразный ингибитор,  $\alpha_2$ -макроглобулин,  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_2$ -антиплазмин, ингибиторы активации плазминогена (ПАИ). Интерес к ингибиторам протеолиза, всегда довольно большой, возрос особенно в последние годы, поскольку, выполняя свои основные функции: блокирование лавинообразного нарастания активности протеаз, обеспечивая взаимодействие протеаз с рецепторами и клиренс их, ингибиторы являются основными протекторами клеток от агрессивной протеолитической деградаци. Последняя включается множеством патологических воздействий, количество которых сильно увеличилось в последнее время.

Большинство работ, посвященных изучению взаимодействия "протеаза-ингибитор", выполнено *in vitro*, гораздо меньше осуществлено *in vivo*, в условиях экспериментальной модели на животных, либо детального исследования какого-либо заболевания. Имеются лишь единичные работы, проведенные с использованием функциональной нагрузки на организм, метода, позволяющего оценить резервные возможности организма, поставленного в экстремальные условия, в которых регуляторные взаимоотношения, в том числе взаимодействие "протеаза — ингибитор", выявляются наиболее ярко.

Целью данного исследования является изучение функциональной активности ингибиторов фибринолиза при двух нозологических формах нефротического синдрома: хроническом гломерулонефрите и амилоидозе в условиях функциональной нагрузки — белковой нагрузочной пробы.

Из всех процессов ограниченного протеолиза именно фибринолиз является наиболее "эндотелиозависимым", поскольку эндотелий синтезирует и освобождает в кровоток специфические активаторы фибринолиза — мериновые протеазы — тканевый активатор плазминогена (ТАП), урокиназу (Ур) и специфический ингибитор активатора плазминогена (ПАИ). На поверхности фибрина, образующегося на эндотелии, осуществляется активация плазминогена и образование активного плазмина, поливалентной сериновой протеазы. На поверхности эндотелия экспрессируется тромбомодулин, рецепторный белок, обладающий профибринолитическим действием.

Из почечных заболеваний, сопровождающихся нефротическим синдромом (НС), взяты для сравнения хронический гломерулонефрит (ХГН) и амилоидоз (Аз), так как при

значительном повреждении эндотелия, характерного для этих заболеваний, Аз присущи субэндотелиальное отложение специфического белка — амилоида — (отсутствующие при ХГН), которые существенно модулируют функцию эндотелиальных клеток.

Для изучения резервной функции эндотелия в условиях нагрузки вместо традиционной окклюзионной нагрузочной пробы в работе использовалась белковая нагрузка по двум причинам. Во-первых, пищевой белок является более специфичным раздражителем для почки, чем окклюзия сосудов, и белковая проба ранее использовалась для выяснения резервов функционирования канальцев почки [5]. Во-вторых, нами показано, что высокая квота пищевого белка в рационе пациента, страдающего ХГН, существенно влияла как на функцию почки, так и на активность фибринолиза [6].

Биохимизм процесса фибринолиза оценивали по наиболее интегративному показателю — функциональной активности активатора плазминогена (ФААП), складывающейся из активностей тканевого активатора плазминогена (ТАП), урокиназы (Ур), плазмина, других протеаз и их взаимодействий с ингибиторами:  $\alpha_2$ -антиплазмином ( $\alpha_2$ -АП),  $\alpha_2$ -макроглобулином ( $\alpha_2$ -М),  $\alpha_1$ -антитрипсином ( $\alpha_1$ -АТ), антитромбином III (АТIII), антиактиватором (АА), о которых судили по функциональной активности этих ингибиторов.

Конкретной задачей данной работы явилось изучение ФААП в связи с функциональной активностью ингибиторов сериновых протеаз при НС, сопровождающем ХГН и Аз, в условиях проведения специфической белковой нагрузки, позволяющей выявить резервы активности ферментов, ингибиторов и их взаимодействий.

**Методика.** Исследования проводились на 31 больном с нефротической формой ХГН, 23 больных с нефритической формой Аз и 15 здоровых лицах. В крови определяли следующие показатели: ФААП по зонам лизиса на стандартных и прогретых фибриновых пластинах по Аструпу, Мюллертцу, Лассену [7], антигены ТАП и Ур иммуноферментным методом ELISA по Bergsdorf et al. [8]. Активность ингибиторов определялась функциональным методом со специфическими ферментами: АА по Беннет [7],  $\alpha_2$ -АП по Ниверовскому в модификации В.Е.Пасторовой [7],  $\alpha_1$ -АТ и  $\alpha_2$ -М аминолитическим методом с хромогенным субстратом — бензоиларгинин-п-нитроанилидом (БАПНА) по В.Б.Хватову и Т.А.Беловой [9], АТIII по Абильтгарду [7]. Нагрузку мясным белком производили по методике, предназначенной для определения фильтрационных резервов почки из расчета 0,7 г на 1 кг массы тела [5]. Кровь для исследования брали натощак и через 2 часа после принятия пациентом пищи (вареное мясо).

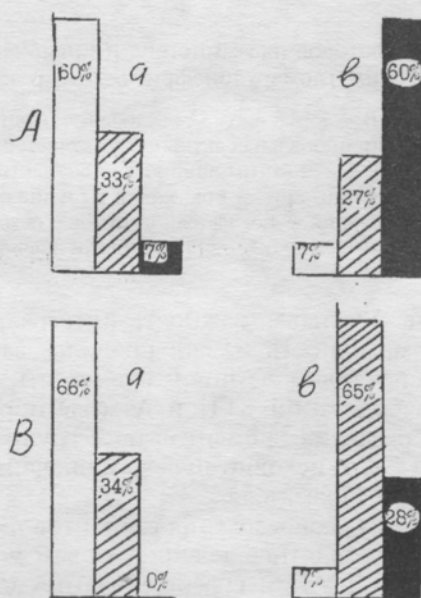


Рис. 1. Относительная частота (в процентах) вариантов течения болезни в подгруппах больных хроническим гломерулонефритом и амилоидозом

А — хронический гломерулонефрит. В — амилоидоз. а — исходно нулевой уровень функциональной активности активатора плазминогена. б — исходно значимый уровень функциональной активности активатора плазминогена. □ — прогрессирование заболевания, ▨ — стабилизация состояния, ■ — ремиссия.

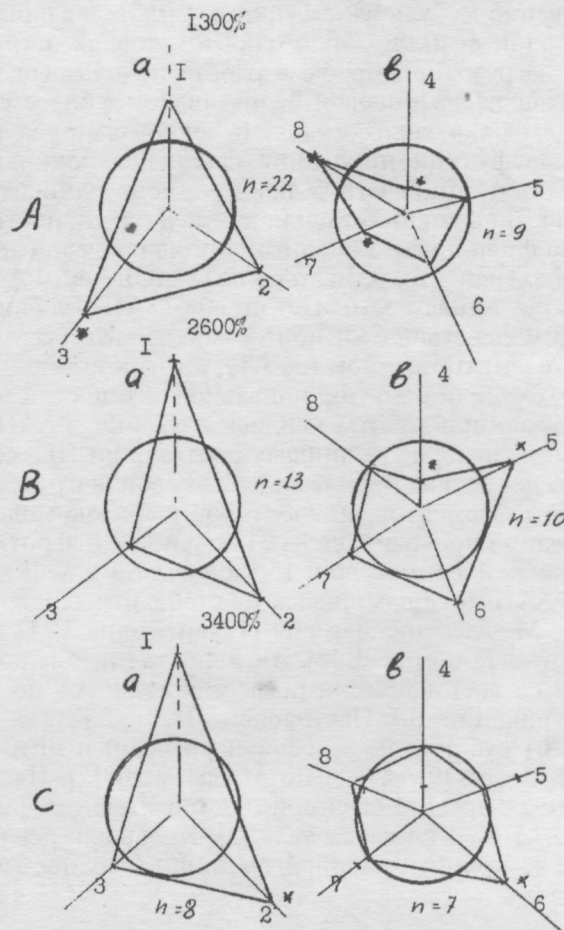


Рис. 2. Спектр активности активаторов плазминогена и ингибиторов фибринолиза у больных хроническим гломерулонефритом и амилоидозом

А — хронический гломерулонефрит, В — амилоидоз, С — здоровые люди, а — активаторы плазминогена, б — ингибиторы фибринолиза, 1 — функциональная активность активатора плазминогена, 2 — урокиназа, 3 — тканевой активатор плазминогена, 4 —  $\alpha_1$ -антитрипсин, 5 — антиактиватор, 6 — антитромбин III, 7 —  $\alpha_2$ -макроглобулин, 8 —  $\alpha_2$ -антиплазмин, круг — показатели в группе с исходно нулевой активностью активатора плазминогена, многоугольник — показатели в группе с исходно значимой функциональной активностью активатора плазминогена, \* — статистически значимая разница показателей.

**Результаты и обсуждение.** Учитывая важность интегрального показателя фибринолиза — ФААП, его информативность и, как правило, вариабельность, известную в литературе [10], мы ретроспективно изучили значимость его в отношении прогноза исхода (в течение 2 лет) заболеваний ХГН и Аз (благоприятный, неблагоприятный, персистирующее течение), разделив пациентов на 2 группы, в зависимости от исходного уровня ФААП: группа "а" с исходно нулевым значением ФААП и группа "б" со значимыми величинами этого показателя.

На рис. 1 показана диаграмма распределения вариантов течения болезни в процентах в этих группах. Видно, что благоприятное течение Аз встречается только у пациентов с исходно значимой величиной ФААП и совершенно отсутствует в случае нулевого его значения. При ХГН число случаев благоприятного исхода равно 67%, при этом в 60% — это пациенты с исходно значимыми величинами ФААП. Таким образом, благоприятное течение ХГН и Аз в абсолютном большинстве связывается с активным фибринолизом.

Каковы взаимоотношения ферментов и ингибиторов фибринолиза, обеспечивающие высокие значения ФААП? Эти данные представлены на рис. 2 в виде круговых диаграмм. По осям круга распределены основные изучаемые показатели: ФААП, антиген Ур, антиген ТАП, активности основных ингибиторов фибринолиза. За 100% приняты показатели



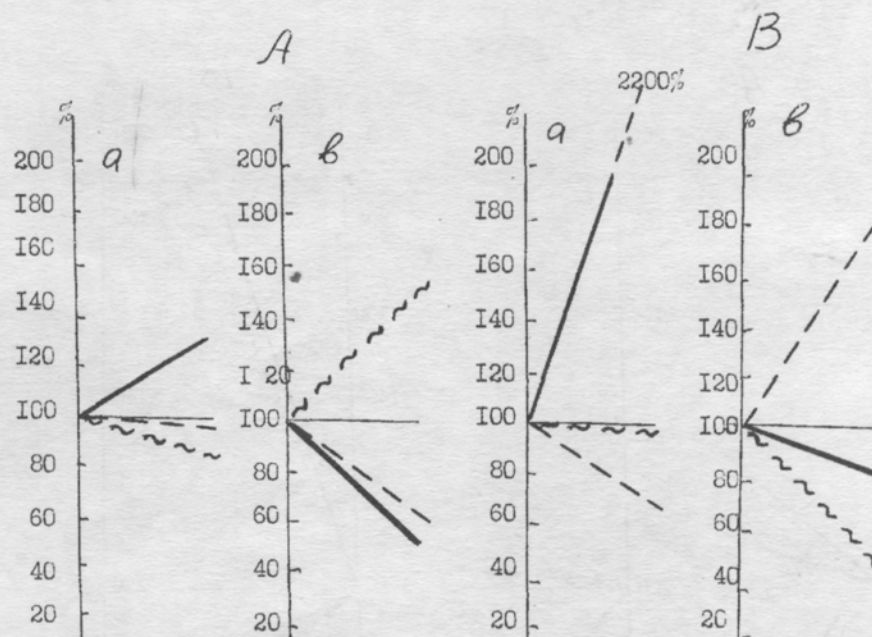


Рис. 3. Изменения (в процентах) активаторов плазминогена после применения белковой нагрузочной пробы у больных хроническим гломерулонефритом и амилоидозом

А — хронический гломерулонефрит, В — амилоидоз, а — исходно нулевой уровень функциональной активности активатора плазминогена, б — исходно значимый уровень функциональной активности активатора плазминогена, — — функциональная активность активатора плазминогена, - - — урокиназа, ~~~ — тканевой активатор плазминогена.

в группе с нулевым значением ФААП, изображаемые в виде круга. Активность показателей в группе со значимыми величинами ФААП вычисляется в % по отношению к группе с ФААП, равной 0. Показатели здоровых людей также распределены в соответствии с исходным уровнем ФААП, которая у 7 человек из 15 оказалась нулевой.

Видно, что высокому уровню ФААП, связанному с благоприятным течением НС при ХГН и Аз, способствует более высокий уровень антигена Ур (для ХГН — это еще и в 2 раза больший уровень антигена ТАП), и сильно, более чем в 3 раза сниженный показатель ингибитора  $\alpha_1$ -АТ. Уменьшение активности  $\alpha_1$ -АТ при НС известно в литературе и его объясняют либо интенсивной фильтрацией в мочу, либо инактивацией свободными радикалами  $O_2^-$ , в избытке образующимися в результате перекисного окисления липидов при НС [11], либо перераспределением белка между кровью, мочой и отечными жидкостями [12]. Резкое снижение активности  $\alpha_1$ -АТ при ХГН и Аз с высоким фибринолизом и благоприятным течением заболеваний может быть результатом комплексообразования его с большинством агрессивных протеаз и элиминацией комплексов гепатоцитами и почками. Тогда более высокие фоновые значения ФААП можно связать с двумя важными, одновременно протекающими процессами: синтезированием и накоплением в кровотоке антигенов ТАП и Ур при ХГН и только Ур при Аз и во-вторых, интенсивным клиренсом из циркуляции "патологических" протеаз, связавшихся, главным образом, ингибитором  $\alpha_1$ -АТ. Уровень же специфических ингибиторов фибринолиза увеличен при значимых величинах ФААП: при ХГН на 30% увеличена активность  $\alpha_2$ -АП, может быть, для купирования чрезмерной активации плазмина, при Аз — это подъем на 40% активности антиактиватора (АА) в результате, возможно, повреждения эндотелия субэндотелиальным амилоидом. На рис. 2 видна довольно четкая тенденция к уменьшению уровня ингибиторов фибринолиза при значимых фоновых величинах ФААП у пациентов с ХГН, при Аз эта тенденция выражена только для 2-х ингибиторов —  $\alpha_2$ -АП и  $\alpha_1$ -АТ. Таким образом, сравнение исходных показателей ФААП и ингибиторов фибринолиза в случаях значимой и нулевой активностей ФААП, коррелирующих соответственно с благоприятным и неблагоприятным течением ХГН и Аз, выявляет, с одной стороны, сходную картину изменений антиге-

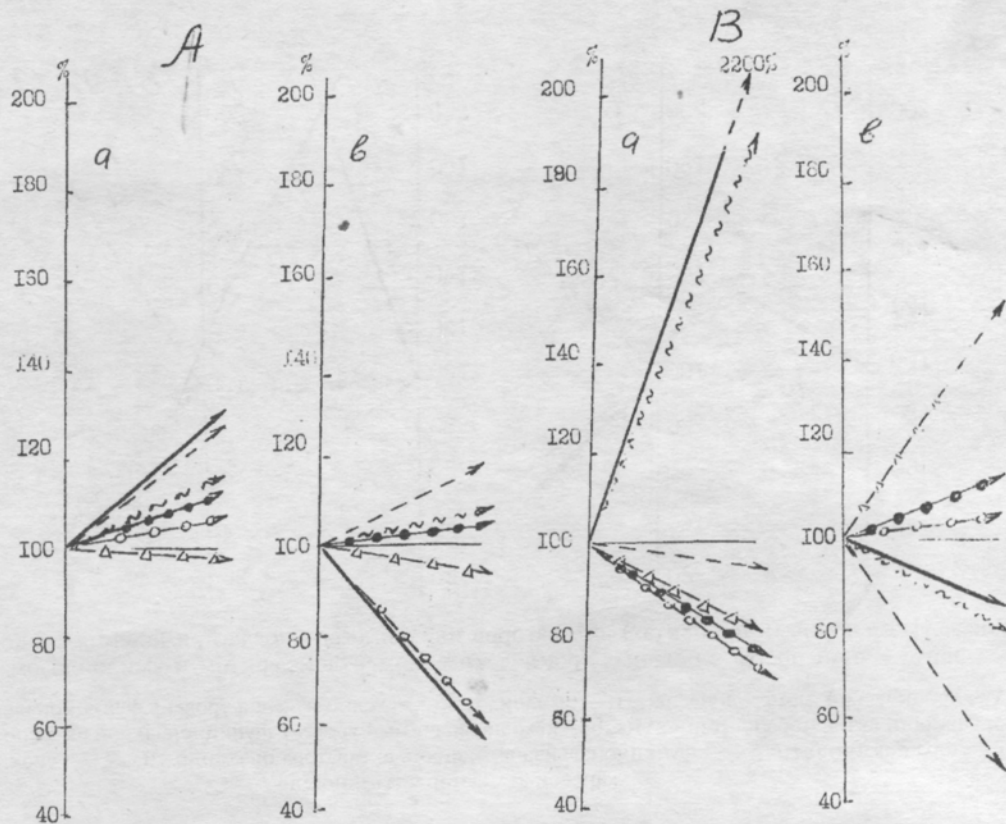


Рис. 4. Изменения (в процентах) ингибиторов фибринолиза после применения белковой нагрузочной пробы у больных хроническим гломерулонефритом и амилоидозом.

А — хронический гломерулонефрит, В — амилоидоз, а — исходно нулевой уровень функциональной активности активатора плазминогена, б — исходно значимый уровень функциональной активности активатора плазминогена, — — функциональная активность активатора плазминогена, - - - -  $\alpha_1$ -антитрипсин, ~~~~ — антитромбин III, ●●● —  $\alpha_2$ -антиплазмин, ○ — антиактиватор, —△—  $\alpha_2$ -макроглобулин.

нов активаторов плазминогена и ингибитора  $\alpha_1$ -АТ для обоих нозологических форм, с другой — явные различия, обусловленные своеобразием этих заболеваний и особенностями взаимодействия ферментов и их ингибиторов.

На рис. 3 и 4 представлены в виде векторных диаграмм изменения ФААП, антигенов ТАП и Ур и основных ингибиторов у 10 пациентов ХГН и 10 пациентов Аз до и через 2 часа после проведения белковой нагрузки. За 100% взяты фоновые значения показателя, изображаемые в виде точки на вертикальной шкале. Изменение показателя изображается в виде вектора, имеющего определенное направление (увеличение — вверх, уменьшение — вниз), а конец вектора указывает величину (в %) изменения биохимического показателя.

Благоприятное течение ХГН и Аз ассоциируется с резервами АП — ТАП при ХГН и Ур при Аз (рис. 3 Аb и 3 Вb). Однако, отсутствие одновременного увеличения ФААП свидетельствует о связывании этих антигенов в комплексы с ингибиторами. И хотя считается, что ингибиторы образуют с протеазами стойкие стехиометрические ковалентно связанные комплексы, но в ряде работ прочность комплексов *in vivo* оспаривается [13]. Может быть, на поверхности фибрина или деградированных белков эти комплексы расщепляются, освободившиеся активаторы плазминогена взаимодействуют с субстратом, и образовавшийся плазмин растворяет отложения фибрина или другие белки. Такая активность свойственна молекулам ТАП, она не присуща урокиназе, резервы которой выявляются при Аз, но и случаи благоприятного исхода при амилоидозе, как это показано в работе, встречаются в 3 раза реже в группе со значимыми величинами ФААП, чем при ХГН. Уменьшение ФААП после белковой нагрузки может определяться и интенсивным выведением из циркуляции "патологических" протеаз,

активность которых также включается в пул ФААП. Клиренс этих протеаз при ХГН, возможно, осуществляется посредством антиактиваторов (рис. 4Ab), а при амилоидозе — через  $\alpha_1$ -АТ (рис. 4Bb), активности которых уменьшаются в 2 раза после белковой нагрузки. При нулевой исходной ФААП (рис. 3 Аа и 3 Ва) белковая проба не выявляет резервов активаторов плазминогена, наоборот, уровни антигенов ТАП и Ур даже уменьшаются после белкового “шока”. Тогда увеличение ФААП в результате белковой нагрузки можно объяснить либо появлением в кровотоке новых количеств агрессивных протеаз, не специфических для фибринолиза, либо расщеплением уже имеющихся комплексов их с ингибиторами и обнаружением в циркуляции как свободных протеаз, так и свободных ингибиторов (рис. 4 Аа и 4 Ва). При этом при ХГН протеазы и ингибиторы не потеряли своей активности, а при Аз несколько ее уменьшили, как это описано при расщеплении комплексов “протеаза-ингибитор” в ряде работ [13, 14].

Таким образом, при белковом “шоке”, являющемся сильным стрессорным воздействием, организм, возможно, использует те же биохимические механизмы реагирования, которые обуславливают его “благоприятные” фоновые показатели, способствующие более благополучному течению болезни. Это — увеличение уровня антигенов ТАП для ХГН и Ур для Аз, уменьшение уровня агрессивных протеаз, о чем косвенно свидетельствуют падение активности  $\alpha_1$ -АТ для Аз и антиактиватора при ХГН. В случае же неблагоприятного течения заболевания и нулевого уровня ФААП белковая нагрузка выявляет резервы “патологических” протеаз, увеличивая ФААП после пробы, но не за счет специфических активаторов фибринолиза. Содержание же специфических активаторов фибринолиза (особенно ТАП) уменьшается.

Полученные данные свидетельствуют о том, что благоприятное течение хронического гломерулонефрита и амилоидоза связано с существованием резервов специфических активаторов плазминогена и возможностью их адекватного освобождения в ответ на стимул.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Пасхина Т.С., Полянцева Л.Р., Кринская А.В., Нартикова В.Ф. *Вопр. мед. химии.* — 1977. — N 2. — С. 41-51.
2. Полянцева Л.Р., Тареева И.Е. “Протеинурия и нефротический синдром”, глава в книге “Нефрология”. 1995. — М.: Мед.
3. Смирнова Т.А., Андреев Г.В., Полянцева Л.Р., Подорольская Л.В. *Тер. архив.* — 1976. — N 2. — С. 89-100.
4. Оглоблина О.Г. *Вопр. мед. химии.* — 1984. — N 1. — С. 3-13.
5. Bosch I.P., Saccagi A., Loner A. *American J. of med.* — 1983. — V. 75, N. 6. — P. 943-950.
6. Самсонов М.А., Андреев Г.В., Полянцева Л.Р., Агаджанов С.А., Невраева О.Г., Подорольская Л.В. *Тер. архив.* — 1980. — T. 52. — С. 135.
7. Методы исследования фибринолитической системы крови. Под ред. Андреев Г.В. — 1981. — М.: МГУ.
8. Bersdorf N., Nillson T., Wallen P. *Thrombosis Haemostasis.* — 1983. — V. 50, N. 3. — P. 740.
9. Хватов В.Б., Белова Т.А. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеаз в крови человека. Методические рекомендации. — 1981. — М.: Мин. Здрав.
10. Carol V., Griffiths M., Geiger M., Merlo C., Furion M., Lanell B., Berder R. *Thrombosis haemostasis.* — 1985. — V. 73. — P. 1173.
11. Кoen C., Уорд П.А., Мак Класки Р.Т. Механизмы иммунопатологии. Пер. с англ. — 1983. — М.: Мед.
12. Андреев Г.В., Полянцева Л.Р., Подорольская Л.В. *Тер. архив.* — 1982. — N 7. — С. 53-57.
13. Bode W., Ruber R. *Fybrinolysis.* — 1994. — Supp. 1. — P. 161-171.
14. Rusell M.E., Guertormous T., Declere P.G., Collen D., Hober E., Homey C.J. *The j. of biological chem.* — 1990. — V. 265. — N. 5. — P. 2569-2575.

#### ACTIVATORS AND INHIBITORS OF FIBRINOLYSIS IN CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS AND AMYLOIDOSIS

L.V.Podorolskaya, G.V.Andreenko, L.R.Polyantseva, I.D.Bumblyte

Lomonosov Moscow State University, School of Biology, 119899 Moscow Vorobievsky Gory; Sechenov Medical Academy, 119021 Moscow, Bolshaya Pirogovskaya 2/16

Functional activities of plasminogen activators (FPAA) and their inhibitors and plasminogen activators's (PA), antigen level were determined in 31 patients with chronic glomerulonephritis, 23 patients with amyloidosis and 15 healthy persons. High FPAA correlated with favourable prognosis of diseases, elevated PA antigen level and diminished  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_2$ -macroglobulin and antiactivator activities. There were decreased PA antigen level and increased inhibitor's activities in group with zero FPAA. Protein loaded functional probe demonstrated the presence of PA reserves in high FPAA patients and “pathological proteolysis” in zero FPAA patients. The last phenomenon was likely connected to nonspecific proteases differed from PA.

Key words: chronic glomerulonephritis, amyloidosis, regulators of limited proteolysis.