

АКТИВНОСТЬ ЭНДОГЕННЫХ ПРОТЕИНАЗ ПРИ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ.

ЧУМАКОВА О.В., КУЗНЕЦОВА А.В., РУДЕНСКАЯ Г.Н., СЕРГЕЕВА Т.В.,
СТЕПАНОВ В.М., ВОЮШИНА Т.Л., ГАРАНКИНА Т.И.

НИИ педиатрии РАМН, химический факультет МГУ.

Изучена активность трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ в сыворотке крови и моче с помощью хромогенных пептидных субстратов у детей с гломерулонефритом. Показана зависимость активности протеиназ от клинической формы гломерулонефрита, его активности, морфологического варианта и наличия артериальной гипертензии. Кроме того установлена корреляция между уровнем протеолитической активности и индексами склероза и воспалительного процесса в почечной ткани. Настоящие исследования подтверждают необходимость дальнейшего изучения вторичных патогенетических факторов в развитии гломерулонефрита.

Ключевые слова: протеиназы, гломерулонефрит, артериальная гипертония.

ВВЕДЕНИЕ. Наряду с иммунным механизмом развития гломерулонефрита (ГН) в последние годы большое внимание привлекают, так называемые вторичные патогенетические факторы, к которым относятся и протеиназы [1, 2, 3, 4]. Нарушение уровня протеолитических ферментов является пусковым механизмом большинства компенсаторных и патологических реакций организма в ответ на воздействие экзо- и эндогенных факторов при различных заболеваниях, в том числе и патологии почек. Нарушение баланса протеиназа-ингибитор при ГН в первую очередь ведет к дискоординации функционирования таких систем организма, как ренин-ангиотензин-альдостероновая, свертывающая, фибринолитическая, калликреин-кининовая, комплементарная и т.д. Среди них ведущее место занимает калликреин-кининовая система (ККС), так как она обладает регулирующим влиянием на вышеперечисленные протеолитические системы за счет того, что ее компоненты входят в состав этих систем. Таким образом ККС является одним из основных регуляторов воспалительных процессов, патологических реакций, участвуя в регуляции артериального давления, сосудистой проницаемости, активации комплемента, гиперкоагуляции, регуляции межклеточных взаимодействий, приводящих к возникновению локальных морфологических поражений, в том числе к склерозированию [5, 6, 7].

Цель настоящей работы - выявить патогенетическое и клиническое значение изменений активности трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ сыворотки крови и мочи при гломерулонефрите у детей.

МЕТОДИКА. При выполнении работы было обследовано 118 детей в возрасте от 3 до 14,5 лет с хроническим и острым гломерулонефритом, в том числе - 46 больных с нефротической формой ГН (22- в активной стадии, 17- в период частичной, 7- в период полной клинико-лабораторной ремиссии), 27 детей со смешанной формой ГН (21- в активной стадии, 6- в частичной ремиссии), у 13 из них заболевание проявлялось нефротическим синдромом с гематурией, у 9 - сочетанием нефротического синдрома с

гематурией и артериальной гипертензией. У 11 детей наблюдалась гематурическая форма ГН, у 14 больных выявлен IgA-нефрит (9- в активной стадии, 5- в ремиссии). Капилляротоксический ГН в стадии частичной ремиссии диагностирован у 6 детей.

Контрольная группа представлена 16-ю практически здоровыми детьми того же возраста.

Все исследования проводились в условиях диеты N7 (с умеренным ограничением белка до 1,0-1,3 г/сут., исключением NaCl и калорийностью не менее 3000 кал.), кроме 8 детей, которые получали диету N5, но так же с ограничением животного белка и исключением поваренной соли.

Биопсия почки проведена у 37 больных. При исследовании нефробиоптатов использовали гистологические, гистохимические, иммуногистохимические методы. Светооптическое изучение нефробиоптата проводили с определением индекса склероза (ИС) и вычислением индекса активности воспалительного процесса (ИА) в почках [8, 9]. В качестве признаков склероза учитывали наличие тотально склерозированных клубочков, сегментарного склероза капиллярных петель гломерул, склероза интерстиция, перигломерулярного склероза, синехий, склероза мезангия, стенок сосудов, атрофии канальцев. Признаками активности воспалительного процесса считали наличие фиброцеллюлярных полулуний, пролиферацию мезангиальных клеток, отложение иммунных комплексов, нейтрофильные лейкоциты в ткани почек, воспаление интерстиция, васкулит.

Активность протеиназ в сыворотке крови и моче определяли по расщеплению хромогенных пептидных субстратов модифицированным методом Erlanger e.a.[10], измеряя поглощение растворов при 410 нм на спектрофотометре в опытных пробирках против соответствующего контроля. Использовались субстраты Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA (для трипсиноподобных протеиназ) и Glp-Ala-Ala-Leu-pNA (для химотрипсиноподобных). После выделения вышеуказанных ферментов в чистом виде из мочи больных с нефротической формой ГН, определения их молекулярной массы, изоэлектрической точки, рН-оптимума, проведения субстратно-ингибиторного анализа, установлено, что активность протеиназ трипсинового (ТП) ряда на 90-92 % обусловлена суммарной активностью плазменного и тканевого калликреинов. Протеиназа химотрипсинового (ХП) ряда, расщепляющая субстрат Glp-Ala-Ala-Leu-pNA - является новой протеиназой с мол. массой 47 кДа, расщепляющей брадикинин, Leu5-энкефалин, превращающей ангиотензин 1 в ангиотензин 2, однако, отличающейся по своим свойствам от известной кининазы2 (изучение гидролиза вазоактивных пептидов проводили в режиме HPLC на кафедре биохимии МГУ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Наиболее высокие показатели активности ТП и ХП были выявлены при нефротической и смешанной форме ГН в активную стадию заболевания (табл.1,2). У детей с нефротической формой острого ГН с затяжным течением в активной стадии уровень ТП крови превышал этот показатель при хроническом ГН ($93,7 \pm 9,5$ и $74,6 \pm 6,5$ нмоль/мл мин соответственно, $p < 0,05$), в то время как в моче отмечалась обратная зависимость ($4,5 \pm 1,2$ и $14,5 \pm 4,0$ нмоль/мл мин, $p < 0,02$), что, повидимому, связано со значительной проницаемостью гломерулярного фильтра в период хронизации для белков крови, в том числе и для плазменного калликреина. Это подтверждается тесной корреляцией между активностью ТП в моче и крови ($r = 0,83$ $p < 0,001$) при различных клинических формах ГН. Выявлена также тесная связь между уровнем ТП крови и суточной протеинурией.

У больных со смешанной формой ГН в активной стадии выявлено повышение активности в крови и моче как ТП, так и ХП. Однако, показатели ТП (рис.1) в крови и моче были выше при сочетании нефротического синдрома с гематурией и без артериальной гипертензии, чем в группе с АГ ($79,2 \pm 6,3$ и $60,8 \pm 6,9$ нмоль/мл мин в

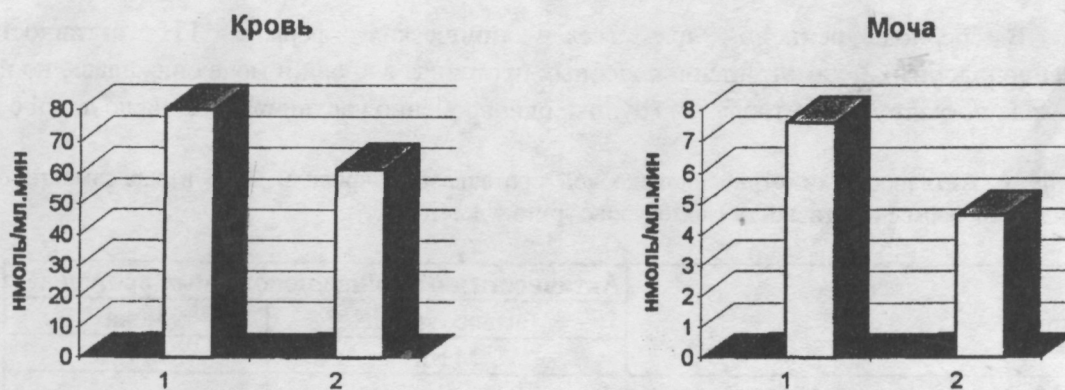


Рисунок 1.
Активность трипсиноподобных протеиназ в сыворотке крови и моче у детей с гипертонией (АГ) и без нее
ХГН, смешанная форма, активная стадия
1. Без артериальной гипертонии n=12
2. С артериальной гипертонией n=9
Различия между группами достоверны.

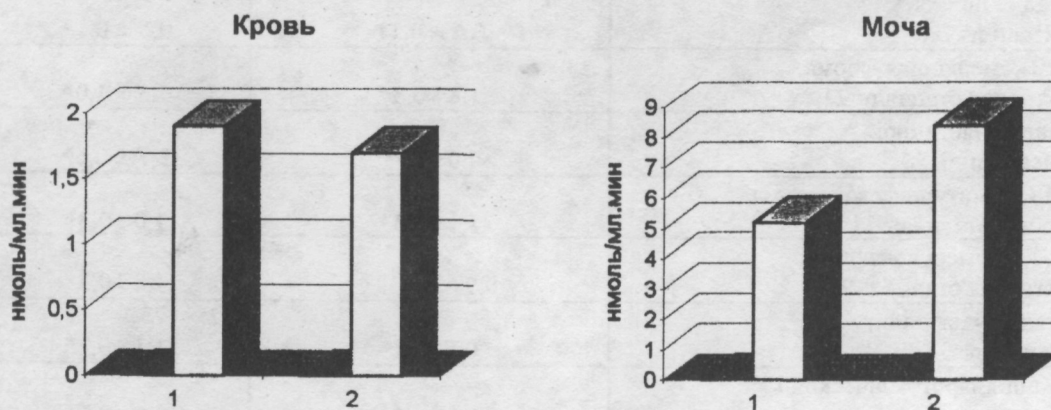


Рисунок 2.
Активность химотрипсиноподобных протеиназ в сыворотке крови и моче у детей с артериальной гипертонией (АГ) и без нее
ХГН, смешанная форма, активная стадия
1. Без артериальной гипертонии n=12
2. С артериальной гипертонией n=9
Различия между группами достоверны

крови, и $7,6 \pm 1,6$ и $4,6 \pm 1,1$ нмоль/мл мин, $p < 0,02$ в моче). В то время, как активность ХП (рис.2) и в крови и в моче была выше в группе с артериальной гипертензией соответственно $1,84 \pm 0,44$ и $1,63 \pm 0,4$ нмоль/мл мин., $8,43 \pm 1,08$ и $5,14 \pm 0,9$ нмоль/мл мин, $p < 0,05$). По-видимому, в генезе артериальной гипертензии при ГН нельзя исключить вазоконстрикторного действия X-протеиназы.

В период ремиссии при всех клинических формах ГН активность трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ в крови и моче снижалась, но не достигала показателей контрольной группы, одновременно увеличивалось число детей с

Таблица 1. Активность химотрипсиноподобной протеиназы в крови и моче в зависимости от клинической формы и активности гломерулонефрита у детей

Группы	Активность химотрипсиноподобных протеиназ	
	сывор. крови	моча
	M+m	M+m
1. ГН в активной стадии n=70 в т.ч.	1,5 ± 0,2*	5,7 ± 0,6*
1. Нефротическая форма, в том числе:	1,8 ± 0,4*	7,7 ± 2,7*
1) острый ГН, затяжное тсч. n=7		
б) стадия частичной ремиссии n=7	1,3 ± 0,3*	1,8 ± 0,8*
2) Хронический ГН		
а) активная стадия n=22	1,5 ± 0,3*	7,6 ± 0,9*
б) стадия частичной ремиссии n=17	0,9 ± 0,2*	1,0 ± 0,3*
в) стадия полной ремиссии n=7	0,6 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*
2. ХГН смешанная форма		
а) активная стадия n=21	1,8 ± 0,3*	7,3 ± 1,0*
б) стадия частичной ремиссии n=6	1,0 ± 0,5*	3,7 ± 0,6*
3. ХГН гематурическая форма активная стадия n=11	1,1 ± 0,3*	1,0 ± 0,3*
4. Ig-A-гломерулонефрит		
а) активная стадия n=9	0,99 ± 0,32*	1,8 ± 0,3*
б) стадия частичной ремиссии n=5	0,5 ± 0,1*	1,1 ± 0,2*
11. Капилляротоксический ГН стадия частичной ремиссии n=6	1,1 ± 0,2*	3,1 ± 0,7*
III. Здоровые дети n=16	0,43 ± 0,04*	0,18 ± 0,04*

*различия достоверны по сравнению с контролем $p < 0,05$

нормальными показателями. Однако при смешанной форме ГН степень и частота Активность трипсиноподобных протеиназ в крови и моче в зависимости от клинической формы и активности повышения протеиназ мало отличались от таковых в активной стадии заболевания (табл. 1,2), что может расцениваться как прогностически неблагоприятный показатель или указывать на нестойкость ремиссии.

У 37 больных проанализировано изменение активности протеиназ в крови и моче в зависимости от характера морфологических изменений в почечной ткани (табл.3).

У 2-х детей с минимальными морфологическими изменениями клубочков выявлено умеренное повышение активности ТП в крови и небольшое повышение ТП и ХП в моче.

У 11 из 16 детей был очагово-сегментарный мезангиопролиферативный гломерулонефрит (МПГН), а у 5 диффузный. Активность обеих протеиназ в крови и моче была выше при диффузно-пролиферативном МПГН (53,4±9,2 и 61,4±8,4 нмоль/мл мин в крови 1,4±0,4 и 5,3±1,2 нмоль/мл мин $p < 0,01$ в моче для ТП, 1,2±0,32 и

1,5±0,4 нмоль/мл мин в крови, 1,9±0,8 и 5,2±1,2 нмоль/мл мин $p<0,05$ в моче - для ХП). У большего числа из этих больных определялись повышенные показатели активности. Более высокими в группе с диффузным МПГН были ИА и ИС (4,6±0,6 и 3,64±0,4 балла, 5,8±0,8 и 3,0±0,4 балла соответственно).

Таблица 2. Активность трипсиноподобных протеиназ в крови и моче в зависимости от клинической формы и активности гломерулонефрита у детей

Группы	Активность трипсиноподобных протеиназ в нмоль/мл·мин.	
	сыворотка крови	моча
	M+m	M+m
1. ГН в активной стадии n=70 в т.ч.	64,6 ± 2,9	7,0 ± 1,7
1. Нефротическая форма, в том числе:		
1) Острый ГН, затяжное теч.	93,7 ± 9,5	4,5 ± 1,2
а) активная стадия n=7		
б) стадия частичной ремиссии n=7	48,6 ± 2,0	1,36 ± 0,54
2) Хронический ГН		
а) активная стадия n=22	74,6 ± 6,5	14,5 ± 4,0
б) стадия частичной ремиссии n=17	47,1 ± 4,7	1,63 ± 0,15
в) стадия полной ремиссии n=7	38,2 ± 4,0	1,0 ± 0,2
2. ХГН смешанная форма		
а) активная стадия n=21	76,6 ± 3,7	6,6 ± 1,3
б) стадия частичной ремиссии n=6	40,3 ± 7,1	4,2 ± 1,1
3. ХГН-эгематурическая форма		
активная стадия n=11	34,7 ± 4,5	0,7 ± 0,24
4. Ig-A-гломерулонефрит		
а) активная стадия n=9	58,1 ± 6,5	1,9 ± 0,5
б) стадия частичной ремиссии n=5	45,8 ± 6,7	1,0 ± 0,2
II. Капилляротоксический ГН		
стадия частичной ремиссии n=6	58,2 ± 8,1	1,1 ± 0,3
III. Здоровые дети n=16	29,3 ± 1,5	0,4 ± 0,05

* различия достоверны по сравнению с контролем $p<0,05$

У 7 детей с мезангиокапиллярным гломерулонефритом (МКГН) уровень активности ТП в крови мало отличался от показателей при диффузном МПГН, а ХП-достоверно превышала таковой. В моче активность ТП оказалась неожиданно более низкой, чем у больных с МПГН (3,3±1,0 нмоль/мл мин), несмотря на то, что частота повышения ТПА была практически одинаковой. ИА и ИС при этой форме ГН был значительно выше, чем при МПГН (7,8±0,8 и 7,3±0,9 баллов).

У 7 детей с фокально-сегментарным гломерулосклерозом (ФСГС) мы выявили наиболее высокие показатели ТПА и ХПА и в крови и в моче (87,3±10,1 и 8,8±2,4 нмоль/мл·мин для ТП, 2,1±0,5 нмоль/мл мин для ХП). Для этой формы ГН характерной была умеренная величина ИА (4,4±0,6 балла) и высокая - ИС (9,1±0,4 балла).

Таблица 3. Активность химотрипсиноподобных и трипсиноподобных протеиназ в крови и моче в зависимости от морфологической формы ГН

Морфологические формы гломеруло-нефрита	Активность химотрипсинопод. протеиназ в нмоль/мл.мин.		Активность трипсинопод. протеиназ	
	сывор. крови	моча	сывор. крови	моча
	M±t	M±m	M±m	M±m
I. Минимальные изменения n=2	0,8 0,65	0,2 0,9	44,9 42,2	0,5 1,3
II. МПГН, n=16 в том числе: очагово- -сегментный n=11	1,3 ± 0,4 1,2 ± 0,32	3,6 ± 0,7** 1,9 ± 0,8*	60,3 ± 6,1* 53,3 ± 9,2*	2,9 ± 0,7* 1,4 ± 0,44*
2) диффузный n=5	1,5 ± 0,4	5,2 ± 1,2*	61,4 ± 8,4*	5,3 ± 1,2*
III. МКГН n=7	2,0 ± 0,4	5,2 ± 1,1*	65,8 ± 5,6	3,3 ± 1,0*
IV. ФСГС n=7	2,1 ± 0,5	18,2 ± 1,2^	87,3 ± 10,1*	8,8 ± 2,4*
Фибро-пластический ГН n=5	1,0 ± 0,3	3,6 ± 0,9*	78,2 ± 9,7	4,4 ± 0,9*

* различия достоверны $p < 0,05$

У 5 больных с фибропластической трансформацией ГН установлено высокое значение ТПА в крови ($78,2 \pm 9,7$ нмоль/мл.мин). Неожиданным было умеренное повышение активности ТП в моче и ХП в крови и в моче ($4,4 \pm 0,9$ нмоль/мл.мин, $1,0 \pm 0,3$ и $3,6 \pm 0,9$ нмоль/мл.мин). При этом были высокими ИА и ИС ($7,2 \pm 1,0$ и $8,6 \pm 0,9$ балла соответственно). По-видимому это может быть обусловлено тем, что у всех детей с фибропластическим ГН был выражен тубуло-интерстициальный компонент и снижены парциальные функции почек.

Установлена прямая связь между уровнем повышения активности ТП в крови и ИА ($r=0,42$ $p < 0,01$), между активностью ТП мочи и ИС ($r=0,63$ $p < 0,01$). Степень повышения активности ХП в большей мере зависела от ИС, что подтверждается тесной корреляцией между активностью ХП в моче и индексом склероза ($r=0,81$ $p < 0,001$).

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют об определенной роли нарушений в системе эндогенных протеолитических ферментов, в частности трипсиноподобных и химотрипсиноподобных, в патогенезе гломерулонефрита в функционально компенсированной (отсутствие хронической почечной недостаточности) стадии. По-видимому, повышение уровня калликреинов на определенном этапе развития гломерулонефрита является компенсаторным. В дальнейшем стойкое повышение трипсиноподобных протеиназ само может являться повреждающим фактором. В свою очередь повышение Х-протеиназы, возможно способствует склерозированию ткани почек за счет своего вазоконстрикторного влияния на сосуды почек.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Cumming A.D., Jeffrey S., Lambic A.T., Robson J.S.* (1989) *Nephron*. **51**, (2)185-191.
2. *Платонова Л.В., Полянцева Л.Р., и др.* (1990) *Урология и нефрология*. **4**, 38-43.
3. *Серов В.В., Пальцев М.А., Мухин Н.А., и др.* (1992) *Тер. Архив*, **64**, (6), 5-10.
4. *Магомедова М.П.* Состояние калликреин-кининовой системы и ингибиторов протеолиза при тубулоинтерстициальных заболеваниях почек у детей. (1993) Дисс. ... канд. мед. наук.-М.
5. *Cameron J.S.* (1987). *Amer. J. Kidney Dis.* **10**, 157- 171
6. *Guach A., Hashimoto H., Sibley K., et al.* (1991) *Amer. J. Physiol.* **260**, F-728 - F-737.
7. *Ueda N., Niimomi Y., Nowada T.* (1991). *Clin. Nephrol.* **36**, (5), 228-233.
8. *Austin N.A., Muens S.R. et al.* (1984). *Kidn. Int.* **25**, 689-695.
9. *Kunis C.L., Kiss B. et al.* (1992) *Clin. Nephrol.* **37**, 1-7.
10. *Erlanger B.F. et al.* (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271-278.

ENDOGENOUS PROTEASE ACTIVITIES IN CHILDREN WITH GLOMERULONEPHRITIS.

O.V. TCHUMAKOVA, A.V. KUZNETSOVA, G.N. RUDENSKAYA, T.V. SERGEEVA,
V.M. STEPANOV, T.L. VOYUSHINA, T.I. GARANKINA.

Institute of Pediatrics, Russian Academy of Science, Moscow.
Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow.

Protease activities in serum and urine of 116 children with glomerulonephritis and 16 healthy children were tested using chromogenic peptide substrates Z-DAla₂-Leu-Arg-pNA and Glp-Ala-ALa-Leu-pNA. We found the dependence between activity of serine proteinases and clinical, morphological forms of primary glomerulonephritis and hypertension.

Key words: proteinases, glomerulonephritis, arterial hypertension