

# СИСТЕМА ПРОТЕЇНАЗА — ІНГІБІТОР ПРОТЕЇНАЗ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНОЮ ХВОРОБОЮ НИРОК У ДИНАМІЦІ НЕФРОПРОТЕКТОРНОЇ ТЕРАПІЇ

*І.І. Топчий, Л.М. Самохіна, А.О. Несен, Л.І. Дерев'янченко*

*ДУ «Інститут терапії імені Л.Т. Малої АМН України», Харків*

**Ключові слова:** нейтральні протеїнази, нетрипсиноподібні протеїнази, кальпаїни,  $\alpha_1$ -інгібітор протеїназ,  $\alpha_2$ -макроглобулін, хронічна хвороба нирок, хронічний пієлонефрит, хронічний гломерулонефрит, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту.

У процесі еволюції хронічної хвороби нирок (ХХН) в організмі хворого формується ціла низка біохімічних зрушень [7]. Істотну роль відіграє система протеїназа — інгібітор протеїназ, її дія виявляється в активізації протеолізу, більше вираженій при хронічному гломерулонефриті (ХГН) порівняно з хронічним пієлонефритом (ХПН) [6]. З активізацією протеолізу зростає рівень нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), серед яких важливе значення має хімаза. Цей фермент бере участь у тканинному утворенні вазоконстрикторного пептиду ангіотензину II, а також може впливати на розвиток фіброзних змін. ХХН характеризується і зростанням активності кальційзалежних протеїназ — кальпаїнів, що виявляється на тлі зниження рівня одного з основних інгібіторів сироватки крові  $\alpha_2$ -макроглобуліну ( $\alpha_2$ -МГ) і вказує на розвиток апоптогенних змін.

Традиційна терапія при ХХН включає призначення інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту (іАПФ), антагоністів рецепторів 1-го типу до ангіотензину II (АТ<sub>1</sub>) і недигідропіридиноних блокаторів кальцієвих каналів [7]. Призначають іАПФ і/або АТ<sub>1</sub> усім хворим на ранніх стадіях ХХН в разі мікроальбумінурії (МАУ) або протеїнурії незалежно від рівня артеріального тиску (АТ). Судять про клінічну ефективність ренопротективної дії препаратів через кілька тижнів або місяців після початку прийому медикаментів. Винятки становлять випадки, коли не досягнуто цільових значень АТ, надлишкова маса тіла в пацієнта, зниження швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) нижче як 50—55 мл/(хв · 1,73 м<sup>2</sup>). У разі недостатнього антипротеїнуричного ефекту будь-якого препарату однієї з груп (іАПФ або АТ<sub>1</sub>) призначають їхню комбінацію. При цьому не враховуються зміни низки біохімічних процесів, які стосуються можливості розвитку апоптозу, та впливу іАПФ та/або АТ<sub>1</sub> на зміни активності НТПП-хімази.

Відомо, що клінічна ефективність іАПФ моєксиприлу пов'язана з виразним і стійким гіпотензивним ефектом у хворих з прогресуючими нефропатіями без порушень азотовидільної функції нирок і зумовлена, як припускають, його дією на активність хімази [8]. Внаслідок лікування гідрофільними іАПФ активність хімази зростає у пацієнтів з низьким її початковим рівнем і не змінюється в разі нормального або високого початкового рівня хімази [3], що свідчить про потребу в індивідуальному підборі препаратів та контролі їхнього впливу з початку лікування для ефективної корекції біохімічних порушень, які стосуються вазоконстрикторних змін. Для пригнічення розвитку апоптогенних змін потрібно вносити доповнення до традиційної терапії, наприклад, призначенням препаратів цитопротекторної дії.

Мета роботи — проаналізувати активність НТПП та кальпаїнів у сироватці крові й сечі хворих на ХХН, ХПН та ХГН у динаміці традиційної терапії з використанням іАПФ та АТ<sub>1</sub> для оцінки біохімічних порушень, пов'язаних з наслідками розвитку вазоконстрикторних та апоптогенних змін, для оптимізації терапевтичних заходів, запобігання виникненню ускладнень.

## **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Досліджено активність нейтральних протеїназ, НТПП, кальпаїнів, трипсинінгібіторну активність  $\alpha_1$ -інгібітора протеїназ (ТІА  $\alpha_1$ -ІП) і активність  $\alpha_2$ -МГ у сироватці крові та сечі хворих на ХХН до та після 2-тижневого терміну лікування.

Обстежено хворих на ХХН: з ХПН I—II ступеня (n = 28) і на ХГН (n = 10). Діагностика відповідає класифікації, розробленій II Національним з'їздом нефрологів України, стадію захворювання визначали з урахуванням показників функції нирок за формулою Кокрофта. Контрольна група — 16 здорових осіб.

Терапія: АТ<sub>1</sub> — ірбисартан або лосартан калію та іАПФ — периндоприл або квінаприл в моно- або комбінованій терапії. Ірбисартан призначали в дозі від 150 до 300 мг/добу, лосартан калію — від 50 до 100 мг/добу відповідно; периндоприл — від 4 до 8 мг/добу і квінаприл — від 10 до 20 мг/добу залежно від рівня АТ.

Активність вказаних протеїназ та їхніх інгібіторів визначали високочутливими ферментативними ( $10^{-10}$ — $10^{-9}$  г ферменту) методами, розробленими в Інституті.

Принцип ферментативних методів засновано на використанні як субстрату протеолітичної реакції імобілізованого на поверхні полістиролу маркерного ферменту (пероксидаза хрону (ПХ)), який попередньо кон'югує із субстратним білком. Для визначення активності протеїназ, НТПП, кальпаїнів, ТІА  $\alpha_1$ -ІП як субстрат використовували альбумін сироватки бика (БСА), для встановлення рівня  $\alpha_2$ -МГ — протамінсульфат.

Для визначення активності протеїназ проводили протеолітичну реакцію розщеплення імобілізованого комплексу шляхом інкубації дослідних зразків у лунках полістиролових плашок при 37 °С протягом 15 хв. Після видаляли продукти реакції відмиванням і визначали оптичну щільність маркерного ферменту за допомогою імуоферментного фотометра-аналізатора Humagreader (Human, Німеччина).

Для визначення НТПП перед протеолітичною реакцією окремо пригнічували ферменти, такі, як трипсин, плазмін, сироватковий калікреїн, а також тонін (має і трипсин-, і хімотрипсинподібну активність) додаванням 1:1 за об'ємом соєвого інгібітора трипсину (СІТ) у концентрації 0,01 мкг/мл і інкубували 5 хв при 37 °С.

Для визначення ТІА  $\alpha_1$ -ІП перед протеолітичною реакцією утворювали комплекс протеїназа — інгібітор протеїназ додаванням до дослідних зразків 1:1 за об'ємом розчину трипсину 8 мкг/мл, інкубували 15 хв.

Для визначення рівня  $\alpha_2$ -МГ після проведення реакції утворення комплексу протеїназа — інгібі-

тор протеїназ до реакційної суміші додавали 1:1 за об'ємом СІТ у концентрації 150 мкг/мл та інкубували 5 хв при 37 °С для зв'язування вільних протеїназ. Рівень  $\alpha_2$ -МГ у досліджених зразках розраховували за залишковою активністю трипсину, пов'язаного з  $\alpha_2$ -МГ.

Активність кальпаїнів визначали за допомогою протеолітичної реакції таким чином: досліджувані зразки вносили в лунки полістиролової плашки з імобілізованим комплексом пероксидази хрону з БСА в дублікаті, потім до одного додавали  $\text{CaCl}_2$  і цистеїн з отриманням кінцевих концентрацій 5 мМ, до другого — етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) з отриманням кінцевої концентрації 10 мМ.

Як контроль використовували розчини трипсину від 0,005 до 8 мкг/мл.

Оцінювали рівень зазначених показників після протеолітичної реакції за залишковою активністю маркерного ферменту, розраховували в мікроеквівалентах задіяних хімічних зв'язків за 1 хв (1 мкЕкв відповідає активності 1 мг/л трипсину за 1 хв) [2].

В експериментах використовували СІТ виробництва Reanal (Угорщина), пероксидазу хрону фірми ICN (США), трипсин фірми Spofa (Чехія), хлорид кальцію, цистеїн, БСА, протамінсульфат, ЕДТА, полістиролові плашки стріпові (Росія).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за методом Стюдента — Фішера з використанням програмного забезпечення Excel.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

До лікування відзначено підвищення активності нейтральних протеїназ, НТПП, кальпаїнів, зниження рівня  $\alpha_2$ -МГ порівняно з контролем у сироватці крові усіх пацієнтів (табл. 1). При ХГН до лікування активність протеїназ виявилась вищою, ніж при ХПН. Отримані дані відображають сутність результатів, описаних раніше [6]. Після лікування простежувалися зміни ТІА  $\alpha_1$ -ІП: у хворих на ХПН — зростання порівняно з контролем, а у хворих на ХГН — зниження порівняно з групою до лікування. Після лікування у хворих з ХПН виявлено тен-

Таблиця 1. Активність протеїназ та їхніх інгібіторів у сироватці крові хворих на ХХН І стадії до та після лікування

Група	Протеїнази, мкЕкв/хв	Нетрипсिन-подібні протеїнази, мкЕкв/хв	Трипсин-інгібіторна активність $\alpha_1$ -інгібітора протеїназ, мкЕкв/хв	$\alpha_2$ -Макроглобулін, мкЕкв/хв	Кальпаїни, мкЕкв/хв
Контроль	0,25 ± 0,07	0,25 ± 0,04	124,0 ± 1,0	26,0 ± 5,0	10,9 ± 1,7
ХПН до лікування	0,8 ± 0,1**	0,8 ± 0,1*	128,0 ± 1,0	4,2 ± 0,8***	55,0 ± 11,0**
після лікування	12,4 ± 0,2***	1,3 ± 0,2**	129,0 ± 1,0*	7,7 ± 2,2**	27,0 ± 5,0*
ХГН до лікування	1,6 ± 0,4***#	1,2 ± 0,2***	127,0 ± 1,0	3,9 ± 1,2*	63,0 ± 18,0***
після лікування	1,2 ± 0,5*	1,4 ± 0,4*	121 ± 4,0#	3,2 ± 1,5*	117,0 ± 30,0***###

Примітка. Різниця з контролем достовірна: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ;

різниця з хворими на ХПН достовірна: #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ .

денцію до зниження активності кальпаїнів, а у хворих на ХГН — підвищення активності кальпаїнів, вірогідне порівняно з групою до лікування.

Аналіз активності досліджених показників у сечі хворих на ХХН дав змогу виявити зростання активності протеїназ, НТПП, кальпаїнів та зниження ТІА  $\alpha_1$ -ІП порівняно з контролем за відсутності суттєвих змін активності  $\alpha_2$ -МГ як до, так і після лікування (табл. 2).

Зростання активності протеїназ на тлі зниження рівня  $\alpha_2$ -МГ та відсутності суттєвого підвищення ТІА  $\alpha_1$ -ІП порівняно з контролем (окрім групи хворих з ХГН після лікування) у сироватці крові та на тлі зниження ТІА  $\alpha_1$ -ІП без суттєвих змін рівня  $\alpha_2$ -МГ у сечі вказує на значний характер активізації протеолізу за умов ХХН: за рахунок як підвищення активності протеїназ, так і зниження інгібіторного потенціалу. Вища активність протеїназ у сироватці крові пацієнтів із ХГН порівняно з ХПН вказує на суттєвий характер реакцій лімітованого протеолізу, що може свідчити про інтенсивність обмінних процесів, утворення активних форм ферментів та пептидів. Але після лікування у цієї групи хворих зростає захист від надлишкової активності протеїназ за рахунок активізації  $\alpha_1$ -ІП у сироватці крові. Цей інгібітор можуть вивільняти мононуклеарні клітини крові.

Зростання активності НТПП (хімаза, частково тонін) у хворих на ХХН як у сироватці крові, так і в сечі вказує на розвиток вазоконстрикції, зростання рівня кальпаїнів та зниження  $\alpha_2$ -МГ — на розвиток апоптогенних змін. Це також може бути зумовлено загальною активізацією системи протеїназа — інгібітор протеїназ і вказує на інтенсивність реакцій лімітованого протеолізу, обмінних процесів.

Виявлені тенденції до зростання активності НТПП у хворих на ХПН більше виражені після лікування і зумовлені скоріше за все дією іАПФ та АТ<sub>1</sub>, які можуть призводити до зростання активності хімази. Відсутність аналогічних змін у хворих на ХГН можливе через вичерпання хімази на стадії формування патологічного стану.

Тенденцію до зростання рівня  $\alpha_2$ -МГ у сироватці крові на тлі лікування при ХПН можна розглядати

як захист від зростання саме активності хімази, тому що цей інгібітор відіграє важливішу роль у пригніченні хімази, ніж  $\alpha_1$ -ІП. Тенденція до зниження активності НТПП у сечі, яка має зворотно-корелятивний характер зі зростанням рівня  $\alpha_2$ -МГ, також може бути зумовлена участю цього інгібітора в пригніченні активності НТПП-хімази.

Зростання активності хімази можна завадити призначенням ліпофільних іАПФ, наприклад, спіраприл, моексиприл, ефективність яких у зниженні рівня хімази доведено [5].

Активізація кальційзалежних протеїназ — кальпаїнів пов'язана зі зростанням концентрації кальцію, що є характерним для ХХН, і зумовлює збільшення інтенсивності й розмірів коронарної кальцифікації порівняно з серцево-судинними захворюваннями [6, 9]. Крім того, під дією хемотаксичних пептидів та інших стимуляторів кальпаїни здатні брати участь в активізації нейтрофілів, що сприяє розвитку тканинного ушкодження, спричиненого системами, які генерують супероксид-аніон і гідролітичні ферменти [1].

Зниження активності кальпаїнів у сироватці крові на тлі традиційної терапії пацієнтів із ХПН вказує на ефективність лікування і потребу його продовження до досягнення вказаного показника контрольного рівня. В сечі цієї категорії хворих висока активність кальпаїнів навіть на тлі лікування може свідчити про їхній високий рівень у нирках і зумовлювати формування структурних та функціональних змін у ниркових тканинах, розвиток гломерулярних змін з потовщенням базальної мембрани, зростанням мезангіального матриксу, розвитком дифузного та вузликового інтеркапілярного гломерулонефриту, що чітко виявляється лише на протеїнурічній стадії захворювання [4]. Щоб запобігти розвиткові вказаних змін, потрібно доповнити традиційну терапію препаратами цитопротекторної дії.

Зростання активності кальпаїнів у хворих на ХГН під час традиційної терапії в сироватці крові має вигляд невтішний. Оскільки їхня активізація зумовлена присутністю кальцію, доцільно призначати цій категорії хворих недигідропіридинові блокатори кальцієвих каналів [7].

Таблиця 2. Активність протеїназ та їхніх інгібіторів у сечі хворих на ХХН I стадії до та після лікування

Група	Протеїнази, мкЕкв/хв	Нетрипсиноподібні протеїнази, мкЕкв/хв	Трипсин-інгібіторна активність $\alpha_1$ -інгібітора протеїназ, мкЕкв/хв	$\alpha_2$ -Макроглобулін, мкЕкв/хв	Кальпаїни, мкЕкв/хв
Контроль	0,000088 ± 0,000006	0,00026 ± 0,000008	0,533 ± 0,001	0,0064 ± 0,0007	0,00025 ± 0,00003
ХПН до лікування	0,0027 ± 0,0003***	0,0028 ± 0,0004**	0,527 ± 0,001*	0,0114 ± 0,0017	0,0169 ± 0,0044*
після лікування	0,0027 ± 0,0003***	0,0039 ± 0,0011*	0,528 ± 0,001*	0,0108 ± 0,0040	0,0116 ± 0,0014***
ХГН до лікування	0,0027 ± 0,0006***	0,0037 ± 0,0016*	0,528 ± 0,002*	0,0062 ± 0,0028	0,173 ± 0,0086*
після лікування	0,0033 ± 0,0009**	0,0019 ± 0,0008*	0,526 ± 0,002***	0,011 ± 0,003	0,0148 ± 0,0072*

Примітка. Різниця з контролем достовірна: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Позитивний терапевтичний ефект простежується в тенденції до зниження активності кальпаїнів в сечі у хворих на ХГН. Це може бути пов'язано зі зменшенням внаслідок терапії аномальної трансгломерулярної секреції білків плазми, тубулярної секреції, бо кальпаїни сприяють збільшенню протеїнурії, пригніченню експресії нефрину [10]. Крім того, зменшення активності, як і секреції кальпаїнів, може пригнічувати розвиток імунного гломерулярного пошкодження.

### ВИСНОВКИ

Лікування хворих на ХПН із використанням іАПФ та АТ<sub>1</sub> активізує захист від надлишкової активності протеїназ за рахунок участі  $\alpha_1$ -ІП сироватки крові.

У динаміці лікування іАПФ та АТ<sub>1</sub> спостерігається тенденція до зростання активності НТПП у хворих на ХПН, що зумовлено, найімовірніше, активізацією хімази. При ХГН зростання активності НТПП не виявлено, що можливо через вичерпання хімази на

стадії формування патологічного стану або участь  $\alpha_2$ -МГ, який здатний пригнічувати цей фермент.

Традиційна терапія хворих на ХПН із використанням іАПФ та АТ<sub>1</sub> сприяє зниженню активності кальпаїнів у сироватці крові, що вказує на ефективність лікування і потребу його продовжувати до досягнення вказаного показника контрольного рівня. Але висока активність кальпаїнів у сечі цієї категорії хворих може зумовлювати формування структурних та функціональних змін у тканинах нирки, що потребує доповнення традиційної терапії препаратами цитопротекторної дії.

Традиційна терапія хворих на ХГН із використанням іАПФ та АТ<sub>1</sub> зумовлює зростання активності кальпаїнів у сироватці крові та зниження їхнього рівня в сечі, що може зменшувати аномальну трансгломерулярну секрецію білків плазми, тубулярну секрецію. Досягнення більшого терапевтичного ефекту можна забезпечити призначенням недигідропіридинових блокаторів кальцієвих каналів.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белова Л.А. Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов // Биохимия.— 1997.— Т. 62, № 6.— С. 659—668.
2. Виноградова Р.П. Одиниці вимірювання активності ферментів // Укр. біохім. журн.— 1999.— Т. 71, № 2.— С. 96—99.
3. Гольгрин Е.Н., Самохина Л.М. Влияние ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента на активность протеолитических ферментов у больных гипертонической болезнью // Медицина сегодня и завтра.— 2001.— № 4.— С. 31—34.
4. Добронравов В.А. Современные подходы к диагностике и лечению диабетической нефропатии // Нефрология.— 2003.— Т. 7, № 2.— С. 93—100.
5. Несен А.О., Топчий И.И., Денисенко В.П., Самохина Л.М. Вплив інгібітора АПФ «Моекс» на активність хімази у хворих із прогресуючими нефропатіями // Новое в клинической фармакологии и фармакотерапии заболеваний внутренних органов: Материалы IV Всеукраинской научно-практ. конф.— Харьков, 2002.— С. 141—142.

6. Самохина Л.М., Топчий И.И., Несен А.О. Система протеїназа-інгібітор протеїназ в оцінці вазоконстрикторних і апоптогенних змін у хворих на хронічну хворобу нирок // Укр. журнал нефрології та діалізу.— 2008.— Т. 17, № 1.— С. 33—37.

7. Смирнов А.В., Каюков И.Г., Добронравов В.А. Концепция факторов риска в нефрологии: вопросы профилактики и лечения хронической болезни почек // Нефрология.— 2008.— Т. 12, № 1.— С. 7—13.

8. Топчий И.И., Несен А.А., Самохина Л.М., Денисенко В.П. Влияние гипотензивной терапии на активность хімазы у больных прогрессирующими нефропатіями // Врачебная практика.— 2001.— № 2.— С. 59—61.

9. Gross M.L., Meyer H.P., Ziebart H. et al. Calcification of coronary intima and media: immunohistochemistry, backscatter imaging, and X-ray analysis in renal and nonrenal patients // Clin. J. Am. Soc. Nephrol.— 2007.— Vol. 2, N 1.— P. 121—134.

10. Peltier J., Bellocq A., Perez J. et al. Calpain activation and secretion promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: evidence from calpastatin-transgenic mice // J. Am. Soc. Nephrol.— 2006.— Vol. 17, N 12.— P. 3415—3423.

## СИСТЕМА ПРОТЕИНАЗА — ИНГИБИТОР ПРОТЕИНАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК В ДИНАМИКЕ НЕФРОПРОТЕКТОРНОЙ ТЕРАПИИ

И.И. Топчий, Л.М. Самохина, А.А. Несен, Л.И. Деревьянченко

Проанализирована активность нетрипсиноподобных протеиназ (НТПП), кальпаинов в сыворотке крови и моче больных хроническим пиелонефритом (ХПН) и хроническим гломерулонефритом (ХГН) в динамике терапии с использованием ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента и блокаторов рецепторов к ангиотензину II 1-го типа. Показано, что после лечения у больных с ХПН активизируется защита от избыточной активности протеиназ, но наблюдается тенденция к повышению уровня НТПП, что обусловлено вероятнее всего активизацией хімазы. Отмечена высокая активность кальпаинов в моче, что может обуславливать формирование структурных и функциональных изменений в почечных тканях и, как следствие, — необходимость дополнения традиционной терапии препаратами цитопротекторного действия. На фоне лечения у боль-

ных с ХГН отмечена активизация кальпаинов в сыворотке крови и снижение их уровня в моче, что может обуславливать уменьшение аномальной трансгломерулярной секреции белков, тубулярной секреции. Достижение большего терапевтического эффекта может быть обеспечено назначением недигидропиридиновых блокаторов кальциевых каналов.

**THE PROTEINASE AND PROTEINASE INHIBITORS SYSTEM  
IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE  
IN THE DYNAMICS OF NEFROPROTECTIVE THERAPY**

**I.I. Topchiy, L.M. Samokhina, A.O. Nesen, L.I. Derevyanchenko**

The analysis of nontrypsinlike proteinase (NTLP) and calpains activities is conducted in blood serum and urine of patients with a chronic pyelonephrite (HPN) and chronic glomerulonephrite (HGN) in the dynamics of therapy with the use of inhibitor of angiotensin converting enzyme and blockers of receptors to angiotensin II of the 1th type. It is shown, that after the treatment in patients with HPN protection from surplus proteinase activity is activated, but there is a tendency to the rise of the NTLP level, that it is conditioned, probably, by activating of chymase. High calpains activity in urine is marked, that can stipulate the formation of structural and functional changes in kidney tissues and, as a result – necessity of addition of traditional therapy by preparations with cytoprotection action. After the treatment of HGN patients the calpains activating in blood serum and decline of their level in urine are marked, that can stipulate reduction of abnormal transglomerular secretion of albumins, and tubular secretion. The achievement of the higher therapeutic effect can be provided by the administration of the non-dihydropyridine calcium channels blockers to the HGN patients.