

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ХРОНІЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ НИРОК У ДІТЕЙ

Сенаторова Г. С., Максєва Н. І.

Харківський національний медичний університет

Досліджено активність нейтральних протеїназ, нетрипсиноподібних протеїназ, еластаз різного походження, хімази, тоніну, трипсинінгібіторну і еластазоінгібіторну активність α -1-інгібітора протеїназ і α -2-макроглобуліна в сироватці крові і сечі дітей з початковою стадією хронічного захворювання нирок до лікування. Показано, що система протеїназа/інгібітор грає істотну роль при хронічному захворюванні нирок, що проявляється в реалізації деструктивних і вазоконстрикторних ефектів. Дисбаланс системи протеїназа/інгібітор створює умови для накопичення екстрацелюлярного матриксу, поглиблення тканинної гіпоксії, розвитку фібротичних змін в нирках.

Ключові слова: система протеїназа/інгібітор, хронічне захворювання нирок, діти.

У 2002 р. в рамках співпраці National Kidney Foundation (NKF, США) експертами (нефрологами, дитячими нефрологами, епідеміологами, спеціалістами з клінічної лабораторної діагностики, дієтології, геронтології, соціального захисту та сімейної медицини) досягнуто консенсусу і визначено поняття: «хронічне захворювання нирок» (ХЗН; CKD – chronic renal disease) та розроблено класифікацію стадій ХЗН [12].

З 2003 р. термін «ХЗН» запропонований також в дитячій нефрології (Hogg R. J., Furth S., Lemeley K. V. et al., 2003). У 2005 р., після затвердження II з'їздом нефрологів України, діагноз ХЗН використовується в нашій країні для всіх вікових груп.

Наявність ХЗН встановлюється незалежно від первинного діагнозу та ґрунтується на наявності пошкодження нирок та/або швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ). Особливої уваги заслуговують хворі з початковою стадією ХЗН. Обґрунтуванням розміщення осіб із нормальною ШКФ в групу ХЗН, з одного боку, є часта маніфестація значних пошкоджень нирок ще до зниження цього ключового показника ниркових функцій, а також те, що дані пацієнти мають підвищений ризик несприятливого виходу ХЗН [5]. З іншого боку, відсутність зниження ШКФ у пацієнтів з ХЗН не виключає наявності прогресуючої нефропатії [10]. Крім того, ідентифікація формування ХЗН на ранніх етапах допоможе клініцистам не тільки загальмувати, а можливо, і зупинити «трагічний марш» в бік хронічної ниркової недостатності (ХНН). Саме регресія хвороби є ультимативною мрією клінічної терапії. Не має сумнівів, що сучасна епідемія ХЗН потребує нових терапевтичних заходів і підходів.

Класичними гістологічними послідовними ознаками ХЗН являються акумуляція екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), інтерстиціальне запалення, втрата капілярної мережі інтерстицію, тубулярна атрофія. Деградація протеїнів інтерстиціального матриксу потенційно можлива, особливо в періоді до кінцевої організації

«інтерстиціального шраму». Під час хронічного тубулоінтерстиціального пошкодження, що є типовим для всіх прогресуючих хвороб нирок, по суті, до втрати «працюючих» нефронів призводить не накопичення ЕЦМ, а саме деструктивна дія запалення на сусідні клітини [11].

Сучасні експериментальні дослідження демонструють суттєву роль системи протеїназа/інгібітор в формуванні ХЗН. Доказано, що кількість ЕЦМ в інтерстиції визначається співвідношенням між продукцією та руйнуванням білків протеазами. Влучення в клітини протеолітичних ферментів (еластаза, катепсину й ін.) призводить до розвитку деструктивних змін, підвищення проникності судинної стінки, цитолізу ендотеліоцитів [2]. В той самий час, фіброз інтерстицію може бути наслідком зменшення активності протеїназ, можливо, завдяки порушення балансу протеїназа/інгібітор [15].

Клінічні дослідження щодо ролі протеїназ в розвитку і прогресуванні ХЗН малочислені, стосуються дорослого контингенту. Перенесення результатів терапевтичних досліджень на дитячий контингент неможливе, бо встановлені суттєві фізіологічні вікові відмінності активності цих ферментів. В доступній літературі ми не знайшли робіт, що освітлювали б участь системи протеїназа-інгібітор протеїназ в патогенезі ХЗН у дітей.

Мета дослідження: вдосконалення ранньої діагностики формування хронічного захворювання нирок у дітей шляхом вивчення активності протеїназ деструктивної і вазоконстрикторної дії та їх інгібіторів в сироватці крові і сечі.

Матеріали та методи

Обстежено 42 дитини, з них до 1-ої групи були включені 34 (18 хлопчиків, 16 дівчаток; середній вік $12,8 \pm 0,6$ років) з ХЗП 1 стадії (ШКФ > 90 мл/хв.) і різною нефрологічною патологією (хронічний гломерулонефрит, спадковий нефрит, хронічний обструктивний пієлонефрит

на фоні вродженої аномалії органів сечовивідних шляхів). Під час дослідження всі пацієнти мали ремісію або неповну ремісію основного захворювання. До 2-ої (контрольної) групи увійшло 8 практично здорових дітей порівняних за віком і статтю. Всі діти 1-ої групи були обстежені за нефроурологічною програмою згідно з протоколами діагностики та лікування дітей з хворобами нирок [3].

Стан внутрішньониркової гемодинаміки оцінювали за рівнем функціонального ниркового резерву (ФНР) за методом J. Bosch (1983) для чого проводили пробу з навантаженням з м'ясним білком (0,7 г білку на 1 кг ваги в умовах адекватного водного режиму) з визначенням ШКФ до і через 2 години після навантаження. ФНР визначали як різницю між базальною і стимульованою ШКФ. ФНР вважали збереженим, якщо спостерігалася збільшення стимульованої ШКФ на 10% і вище; зниженим – якщо збільшення ШКФ відбувалося на 5–9%; відсутнім – якщо після навантаження ШКФ знижувалася або не змінювалася [13]. Наявність зниженого або відсутнього ФНР розцінювали як стан внутрішньоклубочкової гіпертензії (ВКГ).

Досліджували активність нейтральних протеїназ (АП), нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), еластази (Ел), ендотеліальної еластази (ЕЕл), металоеластази (МеЕл), хімази, тоніну, трипсинінгібіторну (ТІА) і еластазоінгібіторну активність (ЕІА) α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІІ), активність альфа-2-макроглобуліну (α -2-МГ) в сироватці крові і сечі до лікування. Активність протеїназ і їх інгібіторів визначали з використанням високочутливих ферментативних методів, розроблених в ДУ «Інститут терапії імені Л. Т. Малої АМН України» (Самохіна Л. М., 1994, 2001, 2002, 2004) [6, 7, 8, 9]. У дослідженнях використовували фотометр-аналізатор імуноферментний Humanreader № 2106-1709 фірми «Human» (Німеччина). Визначення рівня мікроальбумінурії (МАУ) у добовій сечі проводили шляхом осаду поліетиленгліколя комплексу «антиген-антитіло» методом кінцевої точки за допомогою стандартного набору виробництва I.S.E.S.r.l. (Італія) з використанням полуавтоматичного аналізатора MINDRAY BA-88.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою статистичного пакета програми «Statistica 7.0». Для ознак з розподілом відмінним від нормального визначали медіану і інтерквартильний розмах; під час оцінки відмінностей використовували критерії Манна-Уїтні та Краскела-Уоліса. Результати вважалися статистично вірогідними при значеннях $p < 0,05$. Оцінку зв'язку між рядами показників визначали за допомогою методів рангової кореляції Спірмана та Кендала. Всі дослідження відповідали етичним принципам медичного дослідження, що проводиться на людях, які були прийняті Хельсінською декларацією, якісної клінічної практики.

Результати та їх обговорення

У дітей 1-ої групи показники ШКФ знаходилися в межах від 90 до 170 мл/хв. З проявами гіперфільтрації (ШКФ ≥ 140 мл/хв) було 12 (35,3 \pm 8,3%) пацієнтів. При оцінці стану внутрішньоренальної гемодинаміки у 29 (85,3 \pm 6,1%, $p < 0,01$) дітей з ХЗН, що склали переважну більшість, рівень ФНР складав від +3% до -48%. Це дозволило констатувати наявність ВКГ. Підвищений рівень МАУ спостерігався у 27 (79,4 \pm 7,04%) хворих. При чому 22 (64,7 \pm 8,3%) пацієнтів мали рівень мікроальбуміну в сечі від 30 до 300 мг за добу, а 5 (14,7 \pm 6,2%) дитини – вище за 300 мг/добу. Слід зазначити, що у дітей 1-ої групи ризик прогресування ХЗН в бік ХНН був достатньо великим. Наявність перманентної мікроальбумінурії, що свідчить про суттєві порушення клубочкового апарату нирок, або протеїнурії, зниженого або відсутнього ФНР, який є клінічним еквівалентом ВКГ, вважаються істотними факторами, що сприяють розвитку та прогресуванню ХЗН.

В сироватці крові у дітей з ХЗН відзначено вірогідне зменшення загальної активності протеїназ, ТІА α -1-ІІ, ЕЕл, підвищення активності Ел, рівня α -2-МГ порівняно з контролем. Активність хімази, тоніну, МеЕл, суттєво не відрізнялася від показників у здорових дітей (табл. 1).

У сечі виявили в цілому односпрямований характер змін активності протеїназ деструктивної дії та інгібіторів протеїназ в порівнянні з сироваткою крові (табл. 1), а саме зростання активності Ел і α -2-МГ, зменшення загальної активності протеїназ, рівня ЕЕл, ТІА α -1-ІІ та відсутність суттєвих змін ЕІА α -1-ІІ, МеЕл у співставленні з показниками здорових дітей. Відмінність характеру змін активності еластази (загальна активність) від ендотеліальної та металоеластази вказує на суттєвий вклад серінової еластази в прояв загальної активності.

Напрямок активності протеїназ вазоконстрикторної дії (хімази, тоніну) в сечі відрізнявся в порівнянні з сироваткою крові, тобто зафіксовано вірогідне зростання активності хімази і тоніну, співставляючи з показниками групи контролю.

Після проведення ретельного аналізу отриманих результатів дослідження механізм формування ХЗН за участю системи протеїназа-інгібітор протеїназ можна уявити наступним чином. ВКГ, МАУ/протеїнурія пошкоджують клітини клубочкового та тубулярного апаратів нирок. Наявність високого рівня α -2-МГ в сироватці крові і сечі підтверджує цей факт, демонструючи «немотивоване скидання» інгібітора с сечею. Пошкоджені клітини вивільняють цитокіни та фактори росту. Ці медіатори стимулюють заохочення клітин в інтерстицій (нейтрофіли, макрофаги, Т-лімфоцити, фібробласти та інші). Підтвердженням цього є висока активність серінової еластази в сечі, що може свідчити про локальне ниркове накопичення

Активність протеїназ та їх інгібіторів в сироватці крові і сечі

Група обстежених	ХЗН	Контроль	p
Сироватка крові			
АП, г/л год.	0,014 (0,009; 0,031)*	0,095 (0,088; 0,11)	<0,001
Хімаза, Е x 10 ⁻³ нмоль субстрата в хв.	1,202 (0,096; 2,6505)	1,14 (0,339; 2,715)	>0,05
Тонін, Е мкмоль субстрата /хв	0 (0; 0,0013)	0 (0; 0)	>0,05
ТІА α-1-ІІІ, г/л год.	7,62 (7,56; 7,8)	7,9 (7,872; 7,941)	<0,05
Ел, Од/мл	0,275 (0,179; 0,444)	0,0825 (0,076; 0,1)	<0,001
ЕЕл, Од/мл	0,125 (0,055; 0,225)	1,1 (0,938; 1,2)	<0,001
МеЕл, Од/мл	0,135 (0,055; 0,04)	0,105 (0,1; 0,131)	>0,05
ЕІА α-1-ІІІ, Од/мл	242,5 (242; 245,75)	244,5 (243,625; 245,55)	>0,05
α-2-МГ, г/л год.	0,42 (0,28; 0,5)	0,09 (0,0675; 0,12)	<0,001
Сеча			
АП, мг/л год.	0,018 (0,011; 0,021)	0,455 (0,448; 0,475)	<0,001
Хімаза, Е x 10 ⁻³ нмоль субстрата в хв	0,00984 (0,00446; 0,0112)	0,0021(0,0011; 0,0042)	<0,05
Тонін, Е мкмоль субстрата /хв	0,0076 (0,00253; 0,0137)	0,000155(0; 0,001105)	<0,01
ТІА α-1-ІІІ, мг/л год.	31,74 (31,64; 31,78)	31,86 (31,857; 31,865)	<0,01
Ел, Од/мл	0,0015 (0,0012; 0,0023)	0,0007(0,0006; 0,0009)	<0,05
ЕЕл, Од/мл	0,0016 (0,0011; 0,0022)	0,0073 (0,007; 0,0124)	<0,01
МеЕл, Од/мл	0,0016 (0,001; 0,0024)	0,0015(0,0011; 0,0025)	>0,05
ЕІА α-1-ІІІ, Од/мл	0,993 (0,9875; 0,9985)	0,996 (0,9885; 0,9975)	>0,05
α-2-МГ, мг/л год.	2,1 (1,8; 2,34)	0,52 (0,36; 0,6)	<0,001

Примітки: * – медіана та інтерквартильний розмах

нейтрофілів, які вивільняють цю протеїназу [1]. Одноманітний характер змін активності Ел, відсутність вірогідних змін ЕІА α-1-ІІІ в сироватці крові та сечі вказують на відсутність активного її видалення і можливість реалізації її деструктивних і прозапальних ефектів. Прозапальні ефекти Ел визначаються спроможністю посилювати запальні реакції, стимулювати ІЛ-6, ІЛ-8, фрагментувати α-1-ІІІ на хемоатрактанти, які збільшують приплив нейтрофілів до місця патологічної реакції, тим самим, замикаючи «хибне» коло та посилюючи деструктивний потенціал. Ел, яка вивільняється поліморфноядерними лейкоцитами, має високий позитивний заряд, та її катіонна природа може спричиняти пошкодження тканин за рахунок зміни заряду клітинної поверхні або збільшення зв'язування з мембранами клітин, компонентами ЕЦМ. Ел погіршує міжендотеліальні зв'язки, розщеплюючи поверхневі протеїни. «Ендотеліальна травма» призводить до збільшення проникності гломерулярних судин [4]. Це ілюструється помітним позитивним кореляційним зв'язком між рівнем Ел в сироватці крові і мікроальбуміном сечі у дітей з ХЗН ($r = + 0,62$; $p < 0,01$). Участь Ел в деградації тубулярних клітин відображається в наявності позитивного по-

мірного кореляційного зв'язку між рівнем цієї еластази в сечі і мікропротеїнурією ($r = + 0,58$; $p < 0,01$). Еластаза також бере участь в природній деградації матриксних білків. Вона є індуктором літичного потенціалу МеЕл, яка вивільняється з макрофагів в неактивній формі. В групі обстежених дітей така дія Ел відображена в позитивному кореляційному зв'язку між її рівнем і активністю МеЕл ($r = + 0,33$; $p < 0,05$) в сироватці крові.

Деякі з клітин, що були заохочені в інтерстицій, змінюють свій фенотип та продукують білки ЕЦМ [1, 4]. Інгібітори протеїназ попереджають руйнацію матричних протеїнів, що ілюструється високим рівнем α-2-МГ в сироватці крові і, як наслідок, в сечі. Висока активність α-2-МГ може гальмувати апоптогенні механізми по відношенню до матричних протеїнів, що, в свою чергу, сприяє експансії ЕЦМ. Також створює умови щодо накопичення ЕЦМ низька загальна активність протеїназ, відсутність активності МеЕл (металопротеази 12), яка приймає участь у каскаді активації інших металопротеаз, за допомогою чого посилює деградацію ЕЦМ [11]. Таким чином, низька активність зазначених протеїназ і високий рівень їх інгібіторів у дітей мають двійчастий ефект. З одного боку, такий баланс

протеїназа/інгібітор допомагає зберігати ниркові клітини, а з іншого – створює умови для експансії ЕЦМ, що поглиблює гіпоксію тубулярних клітин.

Зростання активності хімази, тоніну в сечі у дітей з початковою стадією ХЗН вказує на активацію тканинного шляху утворення АТІ саме в нирках, що призводить до розвитку локальної вазоконстрикції, гіпоксії, подальшого пошкодження ниркових клітин [11, 14]. Наявність суттєвого впливу на ендотеліальну функцію клубочкового апарату нирки вазоконстрикторних механізмів демонструють кореляційні зв'язки: негативний – між рівнем МАУ і ФНР ($r = -0,46$, $p < 0,05$) та позитивні – між МАУ і рівнями хімази ($r = +0,35$, $p < 0,05$) і тоніну ($r = +0,37$, $p < 0,05$). Присутність помітного позитивного кореляційного зв'язку між активністю хімази і Ел в сечі ($r = +0,64$, $p < 0,01$) демонструє сполучену дію протеїназ деструктивної і вазоконстрикторної спрямованості щодо поглиблення патологічних змін в нирках.

Таким чином, порушення рівноваги в системі протеїназа – інгібітор протеїназ: дисбаланс активності протеїназ деструктивної дії, підвищення активності протеїназ вазоконстрикторної спрямованості – один з основних механізмів формування і прогресування ХЗН у дітей.

Враховуючи істотну роль протеїназ в деструктивних, вазоконстрикторних і фібротичних змінах у нирках та їх вплив на внутрішньониркову гемодинаміку та функціональний стан клубочкового і тубулярного апаратів нирок, виникає необхідність контролю за балансом протеїназа-інгібітор – протеїназ у хворих з ХЗН, починаючи з початкової стадії.

Висновки

1. У дітей з початковою стадією ХЗН визначається односпрямований дисбаланс в системі протеїназа-інгібітор протеїназ в сироватці крові і сечі, що проявляється в зниженні загальної активності протеїназ на фоні підвищеної активності еластази нейтрофільного походження та α -2-макроглобуліну.

2. Зростання активності хімази, тоніну в сечі у дітей з початковою стадією ХЗН вказує на активацію тканинного шляху утворення АТІ саме в нирках, що призводить до розвитку локальної вазоконстрикції, гіпоксії, подальшого пошкодження ниркових клітин.

3. Порушення рівноваги в системі протеїназа – інгібітор протеїназ поглиблює патологічні зміни внутрішньониркової гемодинаміки та функціонального стану клубочкового і тубулярного апаратів нирок.

4. Враховуючи істотну роль протеїназ в формуванні і прогресуванні ХЗН, виникає необхідність контролю за балансом протеїназа – інгібітор протеїназ у хворих з ХЗН, починаючи з початкової стадії.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження системи протеїназа-інгібітор протеїназ на різних стадіях ХЗН та компонентів, які регулюють процес прогресування, можуть спрямувати наступне вивчення по відношенню до нових підходів до діагностики (сечова екскреція цитокінів і факторів зросту) та оптимізувати пошук нових підходів до лікування хронічного захворювання нирок та запобігання формування кардіоваскулярних ускладнень.

Література

1. Белова Л. А. Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов. // Биохимия. – 1997. – 62, N 6. – С. 659–669.
2. Веремеенко К. Н., Досенко В. Е., Нагибин В. С. и др. Протеолитические ферменты и апоптоз // Укр. биох. журн. – 2003. – № 6. – С. 10–24.
3. Наказ МОЗ від 20.07.2005 № 365 «Про затвердження Протоколів лікування дітей за спеціальністю «Дитяча нефрологія»
4. Меншутина М. А. Сравнительная оценка реактивности сосудов, как формы дисфункции эндотелия, у больных атеросклерозом и хронической болезнью почек. // Нефрология. – 2004. – Т.8, № 3. – С. 56–61.
5. Пиріг Л. А., Иванов Д. Д., Таран О. І. та інші. Хронічна ниркова недостатність. – К.: Аврора-плюс, 2004. – 96 с.
6. Самохіна Л. М., Дубинин А. А. Способ определения активности протеиназ или их ингибиторов в биологических жидкостях // МПК G 01 N 33/48, C 12 Q 1/38; Заявка N 4654144 от 22.02.89 г. – Патент России N 1655991 от 20.01.94 г.
7. Самохіна Л. М. Набір для визначення активності нетрипсиноподібних протеїназ, хімази, еластазоінгібіторної активності α -1-інгібітора протеїназ та α -2-макроглобуліна в біологічних рідинах // МПК G 01 N 33/48, A 61 B 19/02; Заявка N 99063318 від 15.06.99 р. – Патент України № 34208 А від 15.02.2001. – Бюл. №1.
8. Самохіна Л. М. Спосіб визначення активності тоніну в біологічних рідинах // МПК G 01 N 33/48; Заявка №2000031817 від 31.03.2000 р. – Патент України № 37647 від 16.02.2004. – Бюл. № 2.
9. Самохіна Л. М., Максимова Н. А. Набір для визначення активності ендотеліальної еластази в біологічних рідинах. // МПК G 01 N 33/48, A 61 B 19/02. – Патент України № 45068А від 15.03.02. – Бюл. № 3.
10. Смирнов А. В., Есаян А. М., Каюков И. Г. Хроническая болезнь почек: на пути к единству представлений // Нефрология. – 2002. – № 4. – С. 11–17.
11. Allison E. A. Can renal fibrosis be reversed? // *Pediatr. Nephrol.* – 2005. – Vol.20. – P. 1369–1375.
12. Anonymous. Part I. Executive summary // *Am. J. Kidney Dis.* – 2002. – Vol.39 (Suppl. 1). – P. 17–31.
13. Bosch J. P., Saccaggi A., Lauer A. et al. Renal functional reserve in humans // *Amer. J. Med.* – 1983. – Vol.75 – P. 943–950.

14. Kobori H., Nangaku M., Navar L. G., Nishiyama A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease // *Pharmacol. Rev.*— 2007.- V. 59(3).- P. 251–287.
15. 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.- V. 17, N 12.- P. 3415–3423.

СОВРЕМЕННЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОЧЕК У ДЕТЕЙ

Сенаторова А. С., Макеева Н. И.

Харьковский национальный медицинский университет

Исследованы активность нейтральных протеиназ, нетрипсиноподобных протеиназ, эластаз различного происхождения, химазы, тонина, трипсинингибиторной и эластазоингибиторной активности α -1-ингибитора протеиназ и α -2-макроглобулина в сыворотке крови и моче детей с начальной стадией хронического заболевания почек до лечения. Показано, что система протеиназа-ингибитор протеиназ играет существенную роль в патогенезе хронического заболевания почек, что проявляется в реализации деструктивных и вазоконстрикторных эффектов. Дисбаланс системы протеиназа/ингибитор создает условия для накопления экстрацеллюлярного матрикса, усугубления тканевой гипоксии, развития фибротических изменений в почках.

Ключевые слова: система протеиназа-ингибитор протеиназ, хроническое заболевание почек, дети.

MODERN VIEW ON THE MECHANISM OF CHRONIC KIDNEY DISEASE FORMATION IN CHILDREN

Senatorova G. S., Makeeva N. I.

Kharkov National Medical University

The activities of neutral proteinase, nonthrypsinlike proteinase, elastase of different origin, α -1-proteinase inhibitor and α -2-macroglobulin in blood serum and urine at children with chronic kidney disease I stage were investigated before treatment. It is shown, that the proteinase-proteinase inhibitor system plays substantial role in chronic kidney disease formation. It apperents in the achievement of destructive and vasoconstrictive effects. The proteinase-proteinase inhibitor dysbalance creates conditions for interstitial matrix accumulation, redoubling of tissular hypoxia, development of fibrotic changes in kidneys.

Key words: protease-protease inhibitor system, chronic kidney disease, children.