

В.Г. Зеленюк, И.И. Заморский, Т.С. Щудрова

ВЛИЯНИЕ СТАТИНОВ НА ФИБРИНО- И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

Исследовано состояние системы протеолиза и фибринолиза в плазме крови и ткани почек крыс при введении статинов (аторвастатина, ловастатина, симвастатина) в дозе 20 мг/кг в условиях экспериментальной миоглобинурической острой почечной недостаточности (ОПН). Продемонстрирована взаимосвязь угнетения активности протеолиза и фибринолиза на фоне ОПН с окислительной модификацией белков. Установлено, что использование статинов на протяжении недели после моделирования экспериментального рабдомиолиза способствует улучшению состояния фибринолитической активности почек крыс в основном за счет повышения неферментативного компонента на 82% при увеличении ферментативной составляющей на 36%. Усиление протеолиза при введении статинов отобразилось в увеличении лизиса альбумина в среднем на 24% и лизиса казеина на 12%. Благоприятное влияние статинов на один из механизмов развития ОПН привело к замедлению темпов прогрессирования патологии и обеспечивало восстановление выделительной функции почек с более выраженным действием аторвастатина по сравнению с ловастатином и симвастатином.

Ключевые слова: статины, острая почечная недостаточность, фибринолиз, протеолиз.

ВВЕДЕНИЕ

В основе патогенеза заболеваний почек среди неспецифических механизмов важное место занимают нарушения согласованности функционирования активаторов и ингибиторов протеолитической системы [1]. В нефроцитах большинство внутриклеточных и некоторые мембранные белки расщепляются убиквитин-протеасомной системой, которая играет важную роль, контролируя содержание регуляторных белков [2]. При патологии в результате активации свободнорадикального окисления образуется большое количество окисленных белков, которым присуща повышенная чувствительность к протеолизу, и фактически в организме протеолитическому расщеплению подвергаются окисленные белки, но не нативные [3]. Дисрегуляция системы протеолиза при ишемическом поражении почек приводит к деградации специфических белков и другим патологическим последствиям, а при хронических заболеваниях почек активируется тубуло-интерстициальное воспаление и фиброгенез [1], вызванный повышением уровня фибриногена и угнетением фибринолиза [4]. Также отмечено, что при ОПН вследствие повреждения проксимального отдела нефрона вероят-

на возможность угнетения фибринолитической активности почек в ответ на нарушения их инкреторной деятельности, которая проявляется снижением секреции урокиназы [5], с последующим развитием уротромбоза [6].

В настоящее время актуальным является изучение использования ингибиторов ГМГ-КоА редуктазы (статинов) в качестве нефропротекторов за счет их плеiotропных эффектов, среди которых рассматривается влияние на активацию тромбоцитов, фибринолиз и протеолиз в почках [7]. Опосредованное воздействие статинов на систему свертывания крови происходит вследствие снижения содержания изопростаноидов, которые являются маркерами окислительного стресса и сильными активаторами тромбоцитов, и, как следствие, смещения фибринолитического баланса внутри сосудистой стенки в сторону повышения фибринолитической активности [8]. По механизму угнетения продукции малых ГТФаз и предупреждения модификации липопротеинов низкой плотности статины тормозят экспрессию ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и увеличивают экспрессию активатора плазминогена тканевого типа (tPA) в эндотелиальных клетках и гладкомышечных клетках сосудов [8, 9, 10]. При сравнении

влияния шести различных статинов (аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин, симвастатин) на компоненты фибринолитической системы (РАI-1, tPA) обнаружен эффект у всех ЛС, за исключением водорастворимого правастатина [11]. В отдельных исследованиях установлена способность статинов стимулировать фибринолиз [12, 13], а влияние на протеолиз имело неоднозначный характер [14, 15].

Поскольку комплексные исследования влияния статинов на состояние процессов фибринолиза и протеолиза в почках на фоне ОПН не проводились, целесообразным является изучение этих плейотропных эффектов ингибиторов ГМГ-КоА редуктазы при экспериментальной почечной патологии, что и составило цель нашего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 35 нелинейных белых крысах-самцах массой 140–180 г, разделённых на 5 групп (n=7): контрольную, модельной патологии и 3 группы животных с ОПН, которым вводили статины (аторвастатин, ловастатин, симвастатин). Статины вводили внутривентрикулярно в 1% растворе крахмала в дозе 20 мг/кг ежедневно на протяжении 7 дней после развития ОПН. Рабдомиолиз с последующим поражением почек моделировали введением 50% раствора глицерола внутримышечно из расчета 10 мл на 1 кг массы [16]. Влияние статинов на фибрино- и протеолитическую активность и функциональное состояние почек изучали на 7-й день развития ОПН на фоне смоделированной гипергидратации организма (энтеральная водная нагрузка в объеме 5% от массы тела) по показателям диуреза, скорости клубочковой фильтрации (СКФ), экскреции белка и ионов натрия. Содержание креатинина в моче определяли методом Поппера, белка в моче – по реакции с сульфосалициловой кислотой, концентрацию ионов натрия в биологических средах – методом пламенной фотометрии [17]. О степени окислительной модификации белков (ОМБ) судили по количеству образованных альдегидных и кетонных групп нейтрального характера при 370 нм [18].

Исследование фибринолитической активности проводили по оценке сте-

пени окраски раствора вследствие образования плазмина в присутствии ϵ -аминокапроновой кислоты (неферментативная фибринолитическая активность (НФА)) или без нее (суммарная фибринолитическая активность (СФА)). Ферментативную фибринолитическую активность (ФФА) определяли по разнице между суммарной и неферментативной активностью тканей [18]. Состояние протеолитической активности определяли на основе реакции с альбумином (лизис низкомолекулярных белков (ЛНМБ)), коллагеном и казеином (лизис высокомолекулярных белков (ЛВМБ)), ассоциированным с азокрасителями оранжевого цвета, которые в щелочной среде дают ярко-красную окраску [20]. Статистическую обработку данных проводили в программах «Statistica 6.0» и «Excel 2007» с использованием U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Корреляционный анализ выборок осуществляли по коэффициенту Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам эксперимента, приведенным в таблице 1, через неделю после моделирования миоглобинурической ОПН у нелеченных животных обнаружили угнетение фибринолиза плазмы крови: СФА снижалась на 36%, НФА – на 33%, ФФА – на 44%, при этом следует отметить тенденцию к восстановлению до уровня контрольных данных НФА и ФФА, что можно объяснить активацией компенсаторных процессов к 7-му дню опыта. При этом в ткани почек сохранялось декомпенсированное состояние фибринолиза, поскольку все его звенья оставались угнетенными: СФА уменьшалась на 51%, НФА – на 67%, ФФА – на 27%. Можно предположить, что в условиях миоглобинурической ОПН показатели активности фибринолиза уменьшались вследствие токсического повреждения проксимальных отделов канальцев нефрона миоглобином с последующим уменьшением синтеза и, соответственно, активности урокиназы и параллельным ингибированием протеолитической активности. Описанная выше патогенетическая взаимосвязь ослабления протеолиза с развитием окислительного стресса подтверждается положительной корреляцией между повышенным содержанием ОМБ₃₇₀ в почках и ЛНМБ

Таблица 1 – Влияние статинов на состояние фибринолиза, протеолиза и окислительной модификации белков при миоглобинурической ОПН ($M \pm m$, $n=7$)

Показатель	Контроль	Патология (ОПН)	ОПН + аторвастатин	ОПН + ловастатин	ОПН + симвастатин
Плазма крови					
СФА, $E_{440}/(ч \times мл)$	3,94±0,22	2,89±0,26*	4,09±0,13 [#]	3,54±0,13 [#]	3,66±0,11 [#]
НФА, $E_{440}/(ч \times мл)$	2,40±0,08	1,81±0,20	2,30±0,06	1,99±0,09	2,26±0,11
ФФА, $E_{440}/(ч \times мл)$	1,54±0,24	1,07±0,08	1,79±0,10 ^{##}	1,89±0,16 ^{##}	1,64±0,09 ^{##}
ЛНМБ, $E_{440}/(ч \times мл)$	4,93±0,13	3,06±0,18**	3,76±0,10 [#]	3,13±0,14	3,63±0,15 [#]
ЛВМБ, $E_{440}/(ч \times мл)$	6,96±0,40	5,46±0,18*	6,03±0,21 [#]	5,57±0,20	6,31±0,21 [#]
Лизис коллагена, $E_{440}/(ч \times мл)$	0,34±0,01	0,25±0,01**	0,29±0,01	0,27±0,01	0,27±0,02
Содержание ОМБ ₃₇₀ , е.о.п./мл	0,87±0,03	1,10±0,05**	0,87±0,07 [#]	0,89±0,07 [#]	0,98±0,08
Ткань почек					
СФА, $E_{440}/(ч \times мг тк.)$	17,4±1,3	11,5±0,5**	19,5±1,0 ^{##}	18,2±0,4 ^{##}	18,7±0,8 ^{##}
НФА, $E_{440}/(ч \times мг тк.)$	11,2±0,4	6,69±0,53**	12,0±0,5 ^{##}	12,4±0,6 ^{##}	12,2±0,6 ^{##}
ФФА, $E_{440}/(ч \times мг тк.)$	6,17±1,63	4,86±0,37**	7,54±1,0 ^{##}	5,83±0,48 ^{##}	6,51±1,2 ^{##}
ЛНМБ, $E_{440}/(ч \times мг тк.)$	37,5±1,0	26,3±2,0**	33,1±0,8 [#]	31,8±0,8 [#]	32,7±0,9 [#]
ЛВМБ, $E_{440}/(ч \times мг тк.)$	13,9±1,0	11,6±0,5	13,2±0,2 [#]	13,1±0,4	12,5±0,8
Лизис коллагена, $E_{440}/(ч \times мг тк.)$	2,62±0,08	1,62±0,09**	1,93±0,04 [#]	1,67±0,15	1,83±0,13
Содержание ОМБ ₃₇₀ , е.о.п./г белка	17,2±0,3	19,6±0,3**	17,3±0,5 ^{##}	17,9±0,2 ^{##}	17,8±0,8

Примечание: Статистически значимые различия с данными группы интактного контроля – * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$); с данными группы модельной патологии (ОПН) – # ($p \leq 0,05$), ## ($p \leq 0,01$). ОМБ₃₇₀ – окислительная модификация белков, определенная при 370 нм, е.о.п. – единицы оптической плотности.

($r=0,54$), ЛВМБ и ОМБ₃₇₀ ($r=0,51$). Угнетение процессов протеолиза у нелеченных животных наблюдали как в плазме крови, так и в ткани почек: ЛНМБ уменьшался на 61% и 43%, лизис коллагена – на 36% и 62% соответственно, а ЛВМБ в плазме крови снижается на 27% при тенденции к снижению на 20% в ткани почек. Как подтверждение взаимосвязи ослабления протеолиза и фибринолиза при патологии свидетельствуют положительные корреляции между СФА и ЛНМБ ($r=0,75$), ФФА и ЛНМБ ($r=0,75$), ФФА и ЛВМБ ($r=0,51$), ФФА и лизисом коллагена ($r=0,87$).

При длительном введении статинов на фоне ОПН отмечали повышение фибринолитической активности плазмы крови на 30% в основном за счет его ферментативного компонента: ФФА увеличивалось в среднем на 66% при тенденции к повышению НФА всего на 21%. Отчетливо способствовали восстановлению СФА аторвастатин (на 42%), ФФА – ловастатин (на 77%). Фибринолиз активизировался также в почках, где статины восстанавливали активность СФА (на 63%), в основном за счет повышения НФА на 82% при увеличении

ферментативной составляющей на 36%. Аторвастатин превосходил средний показатель СФА остальных статинов на 7%, как и контроля на 12%, в основном за счет повышения ФФА на 55% против 20% в группе ловастатина и 34% в группе симвастатина.

Применение статинов способствовало восстановлению протеолиза в условиях данного эксперимента, хотя и не по всем исследуемым параметрам. Наиболее выраженное влияние отмечали в группах аторвастатина и симвастатина по усилению ЛНМБ как в плазме крови (на 23% и 19% соответственно), так и в ткани почек (на 26% и 24% соответственно). Активность деструкции белков с наиболее высокой молекулярной массой, определявшаяся по лизису азоказеина, увеличивалась под действием этих же статинов в плазме крови на 10% и 16%, в ткани почек – на 14% и 8% соответственно, по сравнению с нелечеными животными. Восстановление уровня лизиса коллагена под влиянием статинов проявлялось лишь тенденцией к росту: только аторвастатин оказывал статистически значимое влияние на этот показатель в почках.

Таблица 2 – Показатели функционального состояния почек крыс с миоглобинурической ОПН при лечении статинами (M±m, n=7)

Показатель	Контроль	Патология (ОПН)	ОПН + аторвастатин	ОПН + ловастатин	ОПН + симвастатин
Диурез, мл/2 ч	3,95±0,12	2,81±0,16**	3,60±0,17##	3,22±0,13#	3,28±0,11#
СКФ, мкл/мин	421,9±37,7	145,6±14,4**	421,9±42,1##	354,8±36,5#	375,9±42,5##
Содержание белка в моче, г/л	0,035±0,003	0,081±0,005**	0,044±0,005##	0,048±0,005##	0,043±0,005##
Экскреция Na ⁺ , мкмоль/ч	4,81±0,60	7,03±0,51*	4,61±0,56##	3,02±0,29##	4,57±0,49##

Примечание: Статистически значимые отличия с данными группы интактного контроля – * (p<0,05), ** (p<0,01); с данными группы модельной патологии (ОПН) – # (p<0,05), ## (p<0,01). СКФ – скорость клубочковой фильтрации.

Благоприятное влияние статинов на один из механизмов развития ОПН привело к замедлению темпов прогрессирования патологии и способствовало восстановлению функции почек (табл. 2). Так, у леченных аторвастатином крыс диурез повышался на 28% относительно группы патологии, ловастатином – на 15%, симвастатином – на 18%. СКФ увеличивалась в среднем в 2,6 раза, причем аторвастатин восстанавливал СКФ на 15% эффективнее других статинов. Протеинурия уменьшалась в среднем на 80%, без значительной разницы между ЛС. Статины также способствовали нормализации натрийуреза, уменьшая экскрецию ионов натрия до уровня контроля с выраженным влиянием ловастатина (на 60% ниже показателя интактных животных).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аторвастатин, ловастатин, симвастатин в целом способствовали нормализации процессов фибринолиза и протеолиза на фоне миоглобинурической ОПН, обеспечивая нефропротекторное влияние, проявившееся в восстановлении выделительной функции почек. Более выраженное действие продемонстрировал аторвастатин.

SUMMARY

V.G. Zeleniuk, I.I. Zamorskii,
T.S. Shchudrova
EFFECTS OF STATINS ON
FIBRINOLYTIC AND PROTEOLYTIC
ACTIVITY IN RATS WITH ACUTE
RENAL FAILURE

Our research study was targeted at the examination of the state of proteolysis and fi-

brinolysis in blood plasma and kidney tissue of rats after administration of statins (atorvastatin, lovastatin, simvastatin) at a dose 20 mg/kg under the conditions of myoglobinuric acute renal failure (ARF). The correlation between the depression of proteolytic and fibrinolytic activity was demonstrated during ARF with an influence of an oxidative modification of proteins. As it has been found in our experiments, the weekly use of statins after the experimental simulation of rhabdomyolysis promotes the improvement of conditions of the fibrinolytic activity in the rats' kidney, mainly due to the increase of non-enzymatic components by 82% while the enzymatic fibrinolysis increasing only by 36%. The amplification of proteolysis was displayed in the increased lysis of albumin on the average by 24% and lysis of casein by 12%. Relying on our data, we may conclude that the beneficial effect of statins on the one of the pathological mechanisms of ARF development leads to a slowdown in the progression of disease and provides recovery of renal excretory function with a prevalent effectiveness of atorvastatin.

Keywords: statins, acute renal failure, fibrinolysis, proteolysis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lecker, S.H. Proteolysis by the ubiquitin-proteasome system and kidney disease / S.H. Lecker, W.E. Mitch // J. Am. Soc. Nephrol. – 2011. – Vol.22. – P. 821 – 824.
2. Rajan, V. Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease / V. Rajan, W.E. Mitch // Biochimica et Biophysica Acta. – 2008. – Vol.1782. – P. 795 – 799.
3. Орлова, Е.А. Протеолитическая активность ткани почек при стимуляции

- апоптоза на фоне введения даларгина / Е.А. Орлова // Укр. мед. альм. – 2002. – Т.5, № 6. – С. 106 – 108.
4. Wardle, E.N. Fibrin breakdown products and fibrinolysis in renal disease / E.N. Wardle, G. Taylor // J. Clin. Path. – 1968. – Vol. 21. – P. 140 – 146.
5. Хоменко, В.Г. Хроноритмические изменения функциональной активности почек при патологии / В.Г. Хоменко // Бук. мед. вісник. – 2013. – №2 (66). – С. 178 – 181.
6. Rohovyi, Yu.Ye. Pathophysiological analysis of the polyuric stage of acute renal insufficiency in case of sublimate intoxication / Yu.Ye. Rohovyi, O.V. Zlotar, L.O. Filipova // Бук. мед. вісник. – 2006. – Т. 10, № 2. – С. 108 – 111.
7. Горошко, О.М. Влияние корвитина и липофлавона на тканевую протеолитическую активность в организме крыс / О.М. Горошко // Бук. мед. вісник. – 2012. – Т. 16, № 3 (63), ч. 2. – С. 93 – 96.
8. Holmqvist, G.N. Statins: indications and uses, safety and modes of action / G.N. Holmqvist. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009. – P. 73 – 84.
9. Simvastatin increases fibrinolytic activity in human peritoneal mesothelial cells independent of cholesterol lowering / B. Haslinger [et al.] // Kidney Int. – 2002. – Vol. 62. – P. 1611 – 1619.
10. Никитина, Н.М. Место статинов в комплексной терапии больных ревматоидным артритом / Н.М. Никитина, А.П. Ребров // Болезни сердца и сосудов. – 2009. – №4. – С. 54-59.
11. Wiesbauer, F. HMG-CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells *in vitro*: a comparative study using different statins / F. Wiesbauer, C. Kaun, G. Zorn // Br. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 135. – P. 284 – 292.
12. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) decrease postoperative adhesions by increasing peritoneal fibrinolytic activity / C.B. Aarons [et al.] // Annals of Surgery. – 2007. – Vol. 245, № 2. – P. 176 – 184.
13. Statins therapy: effects on plasma fibrinogen levels and fibrinolysis / R.C. Marchi // J. Nutr. Disorders Ther. – 2011. – S6:001. – P. 1 – 7.
14. Effect of statins on proteolytic activity in the wall of abdominal aortic aneurysms / Abisi S. [et al.] // Br. J. Surg. – 2008. – Vol. 95, Iss. 3. – P. 333 – 337.
15. Statins may enhance the proteolytic cleavage of proBDNF: implications for the treatment of depression / Shih-Jen Tsai // Medical Hypotheses. – 2007. – Vol. 68, Iss. 6. – P. 1296 – 1299.
16. Animal models of acute renal failure / A.P. Singh [et al.] // Pharmacological Reports. – 2012. – № 64. – P. 31 – 44.
17. Рябов, С.И. Функциональная нефрология / С.И. Рябов, Ю.В. Наточин – СПб: Лань, 1997. – 304 с.
18. Мещишен, И.Ф. Метод определения окислительной модификации белков плазмы (сыворотки) крови / И.Ф. Мещишен // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 159 – 160.
19. Патент 30727 Украина, G01N33/48. Способ определения тканевой фибринолитической активности // Боднар Б.М., Кухарчук О.Л., Магальяс В.М., Пенишкевич Я.И., Пишак О.В., Роговый Ю.Е., Сливка В.И., Шаповалов В.П. – №98042121; Заявл. 28.04.1998; Оpubл. 15.12.2000; Бюл. №7. – 2 с.
20. Веремеенко, К.Н. Протеолиз в норме и патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. – К.: Здоровье, 1988. – 199 с.

Адрес для корреспонденции:

58002, Украина,
г. Черновцы, Театральная пл., 2.
Буковинский государственный
медицинский университет,
кафедра фармакологии,
тел. +380 (3722) 3-52-62,
vzeleniuk@gmail.com,
Зеленюк В. Г.

Поступила 14.10.2014 г.