

метаболизма и говорит, на наш взгляд, о наличии в их организме супрессивного влияния на мононуклеарные фагоциты либо об угнетении функционально-компенсаторных возможностей последних.

Таким образом, напрашивается вывод, что у потомства животных с хроническим экспериментальным аутоиммунным поражением печени происходит угнетение поглотительной, метаболической и, особенно, бактерицидной функций моноцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов.

G. V. Bryukhin, A. Yu. Grachev

PHAGOCYTIC ACTIVITY OF THE PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES AND PERITONEAL MICROPHAGES IN THE OFFSPRING OF THE ANIMALS WITH EXPERIMENTAL CHRONIC LIVER AFFECTION

Peripheral blood monocytes and peritoneal macrophages (phagocytic index, phagocytosis intensity, metabolic level) in the offspring of mice with chronic experimental autoimmune liver affection have been studied for different parameters of their phagocytic properties.

The obtained results testify to absorption and bactericidal activity disturbance of mononuclears studied in this group of animals.

Medical Institute, Ministry of Public Health
of the RSFSR, Chelyabinsk

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрущук А. А., Казмирчук В. Е., Леонтович Н. А. Роль антенатальной патологии в становлении иммунитета детей раннего возраста // Антенатальная охрана и профилактика перинатальной патологии.— Киев, 1979.— С. 14—15.
2. Брюхин Г. В., Михайлова Г. И. Антителообразующая способность клеток селезенки потомства самок крыс с хроническим поражением печени // Физиол. журн.— 35, № 2.— С. 97—100.
3. Гордиенко С. М. Одновременное изучение функциональной активности макрофагов и нейтрофилов кожного экссудата в клинических условиях // Иммунология.— 1983.— № 2.— С. 84—87.
4. Закиров И. З. Беременность и плод при болезни Боткина.— Ташкент: ФАН (Наука), 1973.— 137 с.
5. Закревский А. А. Беременность и роды при хронических заболеваниях печени и желчных путей // Антенатальная охрана плода и профилактика перинатальной патологии.— Киев, 1979.— С. 98—99.
6. Иммунологические методы // Под ред. Г. Фримеля.— М.: Медицина, 1987.— 472 с.
7. Маянский Д. Н. Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов.— Новосибирск: Наука, 1981.— 172 с.
8. Мурзалиева Х. М., Кусаинова Г. Беременность и болезнь Боткина.— Алма-Ата: Наука, 1965.— 180 с.
9. Фрейдлих И. С. Система мононуклеарных фагоцитов.— М.: Медицина, 1984.— 272 с.
10. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick E. M. Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils // Lancet.— 1968.— 2.— P. 532—534.

Челябин. мед. ин-т
М-ва здравоохранения РСФСР

Материал поступил
в редакцию 28.01.90

УДК 612.115.1:616.61—089.843

Е. И. Кримкевич

Калликреин-кининовая система почечного аллотрансплантата

Этиологическим фактором острой реакции отторжения пересаженной почки, является иммунный конфликт, который может привести к активации калликреин-кининовой системы (ККС) [3, 10]. Изменения же

© Е. И. КРИМКЕВИЧ, 1990.

активности ККС, тесно связанной со свертывающей и фибринолитической системами [1, 4], могут обусловить сдвиги в этих системах и последующие нарушения в капиллярном русле трансплантата, влияющие на его функцию.

Состоянию ККС трансплантата посвящены немногочисленные исследования, которые касаются, в основном, почечной экскреции калликреина [11, 16]. Практически нет сведений о других компонентах системы, особенно на ранних этапах формирования острой реакции отторжения, когда ее клинические проявления не наблюдаются или слабо выражены.

Цель нашей работы — изучение показателей ККС почечного трансплантата в ранние сроки формирования его отторжения.

Методика

Модель аллотрансплантации (анастомоз *v. renalis* донора с *v. renalis* реципиента по типу «конец в конец») воспроизводили на крысах. Контралатеральную почку удаляли. Эксперимент проведен на 10 животных. Исследования ткани почки (раздельно коркового и мозгового слоев) и мочи проводили до трансплантации и на 4-е, 8-е и 12-е сутки после нее. В эти же сроки определяли содержание креатинина в плазме крови и экскрецию его с мочой. Все показатели в моче рассчитывали на экскретируемый креатинин, а в ткани — на 1 г сырой ткани и 1 мг тканевого белка. О кинингенерирующем звене ККС судили по протаминрасщепляющей активности (ПРА) и активности α_1 -ингибитора протеиназ, об этапе деградации кининов — по активности кининазы II. Кроме того, в моче определяли также эстеразную активность калликреина. Эстеразную и антиэстеразную активности определяли по результату расщепления БАЭЭ [6, 8], антипротеолитическую — казеина [1], протаминрасщепляющую — по методу Веремеенко [1]. Чтобы выделить вклад в протаминрасщепляющую активность других протеиназ (исключая калликреин), параллельно определяли суммарную протеолитическую активность по расщеплению казеина [2], который гидролизует трипсином, урокиназой и другими трипсиноподобными протеиназами, но не гидролизует калликреином. Активность кининазы II определяли по содержанию гистидиллейцина, отщепленного от С-концевого трипептида ангиотензина I [7]. Содержание креатинина определяли с помощью цветной реакции Яффе [9]. Математическую обработку результатов осуществляли с применением критерия *t* Стьюдента.

В дни опыта животные находились в клетках, приспособленных для изучения обмена веществ. Пищевой рацион и двигательный режим были без особенностей.

Результаты и их обсуждение

У интактных животных ПРА в кортикальном слое почки была значительно выше, чем в медуллярном (где обнаруживали лишь ее следы). После пересадки на 4–12-е сутки функционирования трансплантата ПРА в корковом слое возрастала вдвое — от $(92 \cdot 10^{-4} \pm 16,0 \times 10^{-4})$ мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ до $(180 \cdot 10^{-4} \pm 16,8 \cdot 10^{-4})$, а в медуллярной — в десятки раз $(5 \cdot 10^{-4} \pm 0,2 \cdot 10^{-4})$ и $(150 \cdot 10^{-4} \pm 43,7 \cdot 10^{-4})$ соответственно, $P_t < 0,01$. Это нарастание ПРА было пропорционально срокам функционирования трансплантата.

Параллельное исследование общей протеолитической активности ткани почки при воздействии на казеин выявило достоверное снижение этой активности в корковом слое почки-трансплантата и оставшуюся без изменения — в медуллярном слое. Антипротеолитическая активность в кортикальном слое повышалась, причем в наибольшей мере на 4-е сутки после трансплантации, когда она составила $3,48 \pm 0,315$ мкг/мг при норме $1,66 \pm 0,308$ ($P_t < 0,05$). В медуллярном слое это изменение было выражено меньше.

Антиэстеразная активность α_1 -ингибитора протеиназ возрастала и в корковом слое (от $13,5 \pm 1,21$ ИЕ/г до $47,6 \pm 2,75$ ИЕ/г, $P_t < 0,01$), и в медуллярном (от $14,1 \pm 3,39$ до $61,6 \pm 2,91$, $P_t < 0,01$). Возрастание ингибиторной активности оставалось одинаковым в течение всего эксперимента.

У интактных крыс кининазная активность в расчете на массу ткани в различных слоях почки практически не различалась, а в расчете на тканевую белок была выше в медуллярном слое. В аллотрансплантате ее особенно выраженный рост отмечали в самые ранние сроки после пересадки почки (4-е сутки) как в корковом ($41,6 \text{ мкмоль/г} \pm \pm 2,26 \text{ мкмоль/г}$ при норме $22,3 \pm 2,14$, $P_t < 0,01$), так и в мозговом слое ($60,2 \pm 9,62$ при норме $21,4 \pm 4,11$, $P_t < 0,01$).

У крыс с почечным аллотрансплантатом снижалась экскреция креатинина (от $75,8 \cdot 10^{-3} \pm 4,66 \cdot 10^{-3}$ в контроле до $48,7 \cdot 10^{-3} \text{ моль/сут} \pm \pm 6,17 \cdot 10^{-3} \text{ ммоль/сут}$ после трансплантации, $P_t < 0,01$). Значительно уменьшалось также выделение калликреина, определявшееся по его БАЭЭ-эстеразной активности. У реципиентов почечных трансплантатов суточная экскреция калликреина составила $13,3 \text{ кЕ/сут} \pm 1,89 \text{ кЕ/сут}$ (в контроле $40,9 \pm 5,00$, $P_t < 0,01$), а в расчете на экскретируемый креатинин — $267,6 \pm 32,56$ (в контроле $900,3 \pm 118,08$, $P_t < 0,05$).

В то же время экскреция калликреина, определявшаяся по гидролизу им протаминасульфата, имела небольшую тенденцию к увеличению в расчете на креатинин ($37,7 \pm 6,8$ при базальном уровне $29,1 \text{ мкмоль} \pm 4,71 \text{ мкмоль}$) и увеличивалась в расчете на диурез ($1,94 \pm 0,232$ и $1,0 \text{ мкмоль/сут} \pm 0,14 \text{ мкмоль/сут}$ соответственно, $P_t < 0,01$). При этом не возрастала общая протеолитическая активность мочи.

После пересадки почки отмечали более чем четырехкратное возрастание в моче антиэстеразной и антипротеолитической активности. Увеличивалась и кининазная активность. Крысы-реципиенты выделяли почти вдвое больше кининазы II, чем интактные крысы ($8,7 \pm 0,90$ и $4,8 \text{ ед/сут} \pm 0,57 \text{ ед/сут}$ соответственно, $P_t < 0,01$).

Пусковым механизмом, приводящим к отторжению трансплантированного органа, является иммунный конфликт между организмом реципиента и трансплантатом, развивающийся вследствие тканевой несовместимости. В наших наблюдениях в сроки 4—12 сут после аллотрансплантации почки у крыс еще не развивались клинические признаки острой реакции отторжения трансплантата: у животных была умеренная гиперкреатининемия и сниженная, но сохраненная функция почечной экскреции воды и креатинина. Эти результаты совпадают с данными, полученными Gibbons и соавт. [13] в аналогичном эксперименте. Каковы же в эти сроки изменения локальной ККС? Литература ответа на этот вопрос не дает.

В результате наших экспериментов мы не обнаружили в трансплантатах увеличения общей протеолитической активности, что свидетельствует о том, что активность урокиназы, трипсина и других протеиназ в ткани отторгающейся почки не повышалась. Исходя из этого, можно полагать, что увеличение ПРА, обнаруженное нами в корковом и медуллярном слоях почки, связано с гиперсинтезом калликреина. Характерно то, что повышение продукции калликреина отмечено уже на 4-е сутки функционирования трансплантата. Параллельно усилению продукции калликреина повышается преимущественно антиэстеразная активность, антипротеолитическая — возрастает незначительно.

Таким образом, существует контролируемая активация ККС, когда возрастает и активаторный, и ингибиторный потенциалы системы. Обнаруженные изменения больше выражены в медуллярном слое, что, возможно, связано с особенностями локального кровотока и является компенсаторно-адаптационным механизмом, способствующим поддержанию локальной гемодинамики и функции.

Реализация эффектов кининов зависит от их продукции и деградации. В трансплантированных почках на 4-е сутки после пересадки выявили значительное повышение кининазной активности. В последующие сутки она, хотя и оставалась повышенной, но все же на 8—12-е сутки была ниже, чем на 4-е. В то же время увеличение продукции калликреина, кининпродуцирующего фермента, продолжалось пропорционально срокам наблюдений, т. е. в более поздние сроки потенциально

создаются условия меньшего ограничения патофизиологического действия кининов.

В то же время повышение кининазной активности способствует интенсивному образованию ангиотензина II, который как один из факторов ауторегуляции почечной функции в результате уменьшения перфузионного давления способствует снижению клубочковой фильтрации [2], что и отмечалось нами у крыс-реципиентов.

В наших исследованиях экскреция калликреина с мочой, определявшаяся по его БАЭЭ-эстеразной активности, была снижена, что соответствует данным, представленным другими авторами [11, 14, 17]. Но параллельно мы обнаружили усиление экскреции калликреина, определяемой по расщеплению белкового субстрата.

Отсутствие повышения казеинолитической активности в моче, обнаруженное нами, и снижение экскреции урокиназы при отторжении пересаженной почки, по данным Carlson и соавт. [12], не позволяют отнести это повышение экскреции калликреина за счет трипсиноподобных протеиназ, расщепляющих казеин (калликреин этим свойством не обладает [27]). Протаминрасщепляющий потенциал мочи может частично вырасти за счет сериновых протеиназ, происходящих из иммунокомпетентных клеток [15], однако основной причиной его увеличения, видимо, является усиление синтеза калликреина в почках. В избранные нами сроки, согласно результатам структурного анализа, большинство дистальных канальцев, продуцирующих калликреин, еще сохранено.

Чем же объяснить снижение БАЭЭ-активности мочи? Прежде всего резким возрастанием ингибиторной, антиэстеразной, активности. Вследствие связывания ингибитором ферментная активность не определяется. Антипротеолитическая активность изменяется значительно меньше и меньше блокирует скорость гидролиза калликреином белкового субстрата. Отсюда следует, что для суждения о состоянии ККС *in situ* нужно определять и ферментную, и ингибиторную активности, а также использовать разные по химической природе субстраты. Очевидно также и то, что в ранней стадии патологического процесса, в основе развития которого лежат иммунные механизмы, экскреция калликреина с мочой не отражает его активности в почках.

Имеющая место ренальная активация кининогенеза, наблюдаемая в ранние сроки иммунного конфликта, совпадает с обнаруженным в эти же сроки [13, 15] у крыс-реципиентов почечных трансплантатов усилением локального синтеза тромбоксана B_2 , $ПГЕ_2$ и 6-кето- $ПГЕ_{1\alpha}$. Как известно, кинины активируют синтез простагландинов [1, 5]. Можно полагать, что посредством интенсификации синтеза тромбоксана A_2 в ткани кинины способствуют локальному тромбозу сосудов трансплантата, снижению его перфузии и потенцированию деструкции. Кроме того, ККС действует не только опосредованно, но и непосредственно на перфузионное давление в трансплантате и ухудшение его функции в результате усиления образования ангиотензина II благодаря повышению активности кининазы II.

Исходя из изложенного, можно предположить, что калликреин-кининовая система участвует в патогенезе отторжения аллотрансплантированной почки как медиатор возникающих функциональных и структурных повреждений.

Е. И. Krimkevich

KALLIKREIN-KININ SYSTEM OF RENAL ALLOGRAFT

The parameters of kallikrein-kinin system (KKS) in the renal graft tissue (the cortex and medulla) and urine in 10 rats were investigated 4, 8 and 12 days after transplantation prior to the clinical symptoms of graft rejection. Controllable activation of a kinin-generative link of KKS (more pronounced in the medulla than in the cortex) is found. It manifests itself in growth of the kallikrein activity (in proportion to terms of transplantation) and in an increase of the inhibitor level. Kininase activity is observed to be the highest

on the 4th day, in the medulla the degree of increase being higher than in the cortex. Esterolytic activity of urinary kallikrein is observed to decrease, while its proteolytic activity — to increase. The urinary inhibitory and kininase activities increase. The disturbances in renal graft KKS lead to the local vascular thrombosis, decrease in graft perfusion, worsening of its function and potentiation of graft destruction. The data show that kallikrein-kinin system takes part in pathogenesis of renal graft rejection playing a mediator role in the functional and structural changes.

Institute of Urology and Nephrology,
Ministry of Public Health
of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веремеенко К. Н. Кининовая система. — Киев : Здоров'я, 1977. — 183 с.
2. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии. — Там же, 1988. — 20 с.
3. Гомазков О. А. Функциональное значение калликреин-кининовой системы крови в норме и при сердечно-сосудистой патологии : Автореф. докт. дис. д-ра мед. наук. — М., 1977. — 32 с.
4. Гомазков О. А., Комиссарова Н. В. Общие механизмы биохимической регуляции калликреиновой, свертывающей и фибринолитической систем крови // Успехи современной биологии. — 1976. — 82, № 3. — С. 356—370.
5. Дани Д. Ж. (ред.). Почечная эндокринология. — М. : Медицина, 1987. — 667 с.
6. Некрасова А. А., Чернова Н. А., Шарапов У. Б. и др. Уровень калликреина в моче и некоторые показатели функции почек // Урология и нефрология. — 1970. — № 3. — С. 12—16.
7. Павлихина Л. В., Елисева Ю. Е., Поздnev В. Ф. и др. Чувствительный флуориметрический метод определения активности карбоксикапепсина (пептидил-дипептидазы) в сыворотке крови человека по трипептиду ангиотензина¹ // Современные методы в биохимии. — М. : Медицина, 1977. — С. 147—150.
8. Нарткова В. Ф., Пасхина Т. С. Определение антитриптической активности в сыворотке крови человека // Там же. — С. 188—191.
9. Тульчинский М. (ред.) Лабораторные методы клинического исследования. — Варшава : Польское госмедиздательство, 1965. — С. 156—158.
10. Чернух А. М., Гомазков О. А. Подходы к оценке патофизиологического значения кининовой системы организма // Кинины и кининовая система крови. — М., 1976. — С. 12—21.
11. Brouhard B. H., Cunningham III R. J., Berger M. et al. Urinary kallikrein excretion in renal transplant patients // Clin. Nephrology. — 1982. — 17, N 5. — P. 241—246.
12. Carlson S., Hedner U., Nilsson G. M. et al. Kidney Transplantation and fibrinolytic split products in serum and urine // Transplantation. — 1970. — 10, N 5. — P. 366—371.
13. Gibbons C. P., Wiley K. N., Lindsey N. J. et al. Prostaglandin synthesis during renal allograft rejection in the rat // Transplantation Proceedings. — 1986. — 18, N 5. — P. 1102—1105.
14. Haruyama T., Abe K., Sat o et al. Urinary kallikrein excretion in kidney allograft recipients: the possible role of the renal nerve in secretion of renal kallikrein // Kinins-III, Proceedings Int. Conf. Kinin, 1981, Munich, 2—5 Nov. — London, New York, 1983. — P. 1011—1015.
15. Hruby Z., Lowry R. P., Forbes R. D. C. et al. Immune mechanisms and molecular mediators of glomerular injury in experimental nephritis: summary of current results and continuing studies // Transplantation Proceedings. — 1986. — 18, N 4. — P. 664—666.
16. Koolen M. J., van Brummelen P., Paul L. C. et al. Excretion of urokallikrein in renal transplant patients. Relation To graft rejection, renal function and blood pressure // Transplantation. — 1984. — 37, N 5. — 471—474.
17. Spragg Jo., Denney D. L., Tilney N. L. et al. Kallikrein excretion in renal transplant recipients and in uninephrectomized donors // Kidney Int. — 1985. — 28, N 1. — P. 75—81.

Киев. науч.-исслед. ин-т урологии и нефрологии
М-ва здравоохранения СССР

Материал поступил
в редакцию 02.08.89