



21-23 апреля 1997 года в Москве прошел IV симпозиум -
«Химия протеолитических ферментов».

Симпозиум был организован РАН, научным советом по проблемам биоорганической химии и Институтом биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

На симпозиуме были представлены следующие основные секции:

1. Структура, функции и механизм действия протеназ.
2. Ингибиторы протеолитических ферментов.
3. Протеиназы и регуляция физиологических процессов.
4. Ферментативный синтез пептидов.
5. Протеиназы в биотехнологии.
6. Некоторые аспекты применения протеиназ в практических целях

Материалы симпозиума публикуются в двух отечественных журналах «Биоорганическая химия» № 4 и № 5 (симпозиальные доклады) и «Вопросы медицинской химии» № 3 - 5 (по материалам стендовых сообщений). В данном номере представлены первые пять статей по материалам симпозиума.

Соловьева Н. И.

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ ПРИ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

О.Б. ДОВГУН¹, Л.Т. ТЕБЛОЕВА¹, Н.К. ШУМЕЙКО¹, Г.Н. РУДЕНСКАЯ²

¹Московский Медицинский Стоматологический институт, ²Московский Государственный Университет. 119890, Москва, Ленинские горы, МГУ,

Целью данного исследования являлась оценка клинического и патогенетического значения химотрипсино- и трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови при гастроэнтерологической патологии у детей. В настоящее исследование было включено 70 больных и 20 практически здоровых детей в возрасте от 4 до 15 лет. Результаты проведенных исследований показали, что обострение хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта сопровождается активацией протеолитической системы крови и изменением активности α_1 -антитрипсина: рост в период обострения и тенденция к снижению в дальнейшем, что обеспечивает равновесие в системе протеиназы - ингибиторы при небольшом сроке заболевания. При функциональных изменениях желудка и двенадцатиперстной кишки сдвигов в этой системе не отмечено. Отсутствие нормализации изучаемых показателей после проведенного лечения у больных хроническим гастродуоденитом и язвенной болезнью указывает на необходимость продолжения лечения после выписки из стационара под контролем ферментов сыворотки крови.

Ключевые слова: протеиназы, ингибиторы протеиназ, сыворотка крови, гастроэнтерологическая патология.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема заболеваний пищеварительного тракта у детей является одной из наиболее актуальных в педиатрии в связи с их широкой распространенностью. В последнее время все большее внимание привлекают протеолитические ферменты и их ингибиторы. Большой интерес к этим ферментам объясняется тем, что, с одной стороны, протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта выполняют деструктивную «пищеварительную» функцию, участвуя в процессе гидролиза белков, а с другой протеиназы тканей и крови выполняют важные регуляторные функции, участвуя в важнейших биологических процессах организма: обмене белков, свертывание крови, фибринолизе, воспалении, аллергических реакциях, а также в функционировании калликреин-кининовой системы [1,2,3,4]. При прогрессировании патологии органов пищеварения большое значение придается изменению активности протеиназ и их ингибиторов не только желудочно-кишечного тракта, но и тканевым протеиназам [5,6,7]. В связи с этим исследование протеолитического потенциала крови у больных с гастроэнтерологическими заболеваниями может иметь диагностическое и прогностическое значение.

МЕТОДИКА. Под наблюдением находилось 70 больных в возрасте от 4 до 15 лет с гастроэнтерологической патологией: 1 группу составили 10 детей с функциональными изменениями желудка и двенадцатиперстной кишки, 2 группу - 30 больных хроническим гастродуоденитом (ГД) (по данным эзофагогастродуоденоскопии разделены на

подгруппы: 2А - гипертрофический ГД, (n=14), 2Б - эрозивный ГД, (n=7), 2В - поверхностно распространенный ГД, (n=5), 2Г - субатрофический ГД, (n=4); 3 группу - 10 больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, 4 группу - 12 детей с сочетанием хронического ГД с хроническим колитом, 5 - 8 больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки с хроническим колитом. На основании данных эзофагогастродуоденоскопии в 4 группе больные разделились следующим образом: гипертрофический ГД (4А, n=3), эрозивный ГД (4Б, n=4), поверхностный ГД (4В, n=20, субатрофический ГД (4Г, n=3).

Диагноз установлен на основании клинических, инструментальных и лабораторно-морфологических исследований.

В качестве контроля исследовали 20 практически здоровых детей. Исследования проводились в стадиях обострения, неполной и полной ремиссии.

1. Определение трипсиноподобной протеиназной активности (ТПА1) сыворотки крови по субстрату Z-L-Ala-Leu-Arg-pNa [8]. Данный субстрат отвечает специфичности протеиназ, близких к трипсину (тромбину, калликреину и др.).

Для получения сыворотки крови брали кровь в количестве 5 мл без антикоагулянтов, и после свертывания ее в пробирке центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин. Сыворотку отсасывали и хранили до исследования в морозильной камере при -20°C не более 1 месяца. При контрольном исследовании протеиназной активности свежеприготовленной сыворотки и после замораживания разницы не отмечено. Размораживание проводили при комнатной температуре в течение 1 часа.

Активность протеиназ в сыворотке определяли модифицированным методом по расщеплению хромогенного субстрата Z-D-Ala-Leu-Arg-pNa. Для этого в пробирки, содержащие 2,5 мл 0,05М трис-НСl рН 8,0, добавляли по 50 мкл сыворотки крови и 50 мкл субстрата. Инкубационную смесь помещали в термостат при -37°C и выдерживали в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50 % уксусной кислоты. Затем измеряли поглощение растворов на спектрофотометре при длине волны 410 нм в опытных пробирках против соответствующего контроля.

$$A = \frac{D_{410} \cdot 0,37 \cdot 1000}{t \cdot V},$$

Протеиназную активность рассчитывали по формуле: где D_{410} - разность поглощения между опытом и контролем, V - объем аликвоты сыворотки крови, t - время реакции в минутах, 0,37 - коэффициент экстинкции паранитроанилида и объема инкубационной смеси.

Полученные данные обрабатывались методом вариационной статистики. Активность выражали в мкмоль субстрата, расщепляемого ферментом в минуту.

2. Определение активности α_1 -антитрипсина (α_1 АТ) и α_2 -макроглобулина (α_2 МГ), трипсиноподобных протеиназ (ТПА2), проводилась комплексным методом с использованием субстрата N-бензоил-L-аргинин-паранитроанилида (БАПНА) [9].

3. Определение химотрипсиноподобной протеиназной активности (ХПА) сыворотки крови по субстрату Glp-Ala-Ala-Leu-pNa [8].

Использованный нами субстрат Glp-Ala-Ala-Leu-pNa отвечает специфичности протеиназ, близких к химотрипсину (катионин G, сериновая эластаза лейкоцитов и др.). Забор крови, условия хранения сыворотки крови, ход исследования и методы расчета протеиназной активности были теми же, что и в случае определения ТПА1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Анализ результатов исследования показал, что активность хипотрипсино- и трипсиноподобных протеиназ была повышена у больных всех групп кроме 1, показатели которой не отличались от нормы (таблица 1). Максимальная активность ферментов (ТПА и ХПА) отмечена у больных 3-5 групп: у больных 3 группы активность была повышена в 4 раза, 4 группы - 3,5-4 раза, 5 группы - в 4-6,5 раз. Таким образом наибольшее изменения ферментативной активности

Таблица 1. Содержание протеиназ и ингибиторов в сыворотке крови при гастроэнтерологической патологии у детей.

Группы	ХПА нмоль/мин· мл	ТПА1 нмоль/мин· мл	ТПА2 нмоль/с·л	α_1 -АТ мкмоль/с·л	α_2 -МГ мкмоль/с·л	ТПА2/ α_1 - АТ
1 группа (n=10)	0,42±0,5	27,3±0,9	55,7±3,6	9,1±0,8	0,89±0,6	6,12
2 группа обострение	1,29±0,17	77,1±1,4	192±2,1	22,5±0,4	1,56±0,1	8,54
неполн. рем.	0,59±0,06	42,3±1,2	79,2±1,3	13,1±0,6	0,85±0,04	6,0
ремиссия (n=30)	0,44±0,08	30,2±0,9	66,2±1,2	9,1±0,3	0,9±0,15	7,27
3 группа обострение	1,79±0,3	115,6±1,4	215±7,5	6,6±0,5	1,9±0,15	48,4
неполн. рем.	0,65±0,07	53,9±0,5	94,5±2,9	7,2±0,8	1,12±0,15	13,2
ремиссия (n=10)	0,55±0,04	40,6±0,03	70,8±1,9	7,8±0,6	1,06±0,07	9,0
4 группа (n=12):	1,75±0,07	120,3±3,4	230,3±5,4	10,3±1,2	1,9±0,1	23,4
обострение	0,82±0,09	63,4±3,5	96,7±3,2	9,2±1,6	1,2±0,3	10,4
неполн. рем.	0,44±0,06	32,5±2,5	73,5±1,3	9,1±0,2	0,93±0,06	8,07
ремиссия						
5 группа (n=8)	2,8±0,07	165,8±3,6	260,5±5,6	4,7±0,9	2,7±0,3	55,3
обострение	1,7±0,1	79,6±2,5	120,8±2,3	6,7±0,5	1,8±0,23	17,9
неполн. рем.	0,55±0,04	42,1±0,7	75,6±3,4	7,6±0,3	0,9±0,09	9,8
ремиссия						
Контроль (n=20)	0,43±0,04	28,6±0,7	64,1±3,1	9,2±0,8	0,9±0,8	6,96

Результаты представлены как $M \pm m$. В скобках дано количество проанализированных историй болезни. Различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

выявлены у детей с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и у больных с сочетанной патологией, что по-видимому связано с выраженными деструктивными изменениями слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и присоединением хронического колита. Под влиянием лечения показатели снижались и в стадии ремиссии приближались к норме. Показатели ТПА2 изменялись больше, чем ТПА1, что говорит о большей специфичности субстрата БАПНА.

Исследование ингибиторной активности сыворотки крови показало повышение α_1 -АТ у больных 2 группы в 2,4 раза и 4 группы в 1,2 раза, снижение у больных 3 (в 1,4 раза) и 5 групп (в 1,9 раза) в период обострения. Уровень α_2 -МГ повышался во всех группах, кроме 1 (таблица 1). В стадии ремиссии показатели активности α_1 -АТ приближались к значениям контрольной группы, но у больных 3 и 5 групп они были снижены. На основании данных исследования активности ингибиторов можно сделать вывод, что при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (3 и 5 группы) отмечается истощение ингибиторного потенциала крови, что согласуется с литературными данными [10,11,12].

Для выявления степени истощения ингибиторов крови проведено исследование активности протеиназ и их ингибиторов в стадии обострения в зависимости от длительности хронического гастродуоденита и язвенной болезни двенадцатиперстной

кишки. Данные представлены в таблице 2. Активность протеиназ увеличивалась, а уровень α_1 -АТ снижался (в 3 раза) при сроке заболевания более 5 лет у больных язвенной болезнью (группы 3,5) и при сочетании хронического гастродуоденита с хроническим

Таблица 2. Изменение активности ферментов сыворотки крови в зависимости от длительности заболевания (в стадии обострения).

	ТПА1 нмоль/ мин·мл	ТПА2 нмоль/с·л	ХПА нмоль/ мин·мл	α_1 -АТ мкмоль/л·с	α_2 -АГ мкмоль/с·л	ТПА2/ α_1 -АТ
2 группа						
1 год (n=13)	59,4 \pm 1,3	164,2 \pm 4,2	0,98 \pm 0,09	25,5 \pm 1,3	1,72 \pm 0,07	6,56
5 лет (n=10)	78,2 \pm 3,4	193,2 \pm 3,1	1,34 \pm 0,06	22,3 \pm 1,7	1,65 \pm 0,05	8,6
↑ 5 лет (n=7)	107,6 \pm 4,3	227,9 \pm 2,7	1,6 \pm 0,08	17,2 \pm 0,9	1,2 \pm 0,06	13,3
3 группа						
1 год (n=4)	95,4 \pm 2,3	178,1 \pm 3,2	1,58 \pm 0,07	11,2 \pm 1,3	2,1 \pm 0,09	15,8
5 лет (n=2)	115,7 \pm 2,3	208,2 \pm 3,7	1,8 \pm 0,09	5,2 \pm 0,9	1,8 \pm 0,1	40
↑ 5 лет (n=4)	135,9 \pm 3,4	257,6 \pm 4,1	2,03 \pm 0,06	2,7 \pm 0,2	1,75 \pm 0,09	95
4 группа						
1 год (n=4)	105,3 \pm 3,4	190,5 \pm 3,8	1,54 \pm 0,09	13,2 \pm 1,05	1,79 \pm 0,09	14,6
5 лет (n=4)	120,6 \pm 2,8	234,5 \pm 5,3	1,75 \pm 0,04	11,3 \pm 0,1	1,85 \pm 0,07	20,7
↑ 5 лет (n=4)	135,9 \pm 4,5	265,2 \pm 2,7	1,96 \pm 0,08	6,4 \pm 0,06	2,1 \pm 0,05	41,4
5 группа						
1 год (n=4)	139,2 \pm 3,6	231,7 \pm 3,4	2,7 \pm 0,03	6,15 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	37,5
5 лет (n=2)	175,2 \pm 4,1	266,6 \pm 3,9	2,8 \pm 0,06	3,9 \pm 0,09	2,8 \pm 0,07	68,5
↑ 5 лет (n=2)	206,5 \pm 2,9	312 \pm 5,8	3,2 \pm 0,07	2,6 \pm 0,07	2,85 \pm 0,04	120
Контроль (n=20)	28,6 \pm 0,7	64,1 \pm 3,1	0,43 \pm 0,04	9,2 \pm 0,8	0,9 \pm 0,3	6,9

Результаты представлены как $M \pm m$. В скобках дано количество проанализированных историй болезни. Различие значений статистически достоверно ($p < 0,01$)

колитом (группа 4), что говорит об истощении ингибиторного потенциала с увеличением длительности заболевания и при сопутствующем хроническом колите.

Повышенные показатели активности α_2 МГ сохранялись приблизительно на одном уровне не зависимо от срока заболевания во всех группах (таблица 2).

Представляет интерес анализ результатов исследования протеиназ и их ингибиторов в зависимости от эндоскопической картины слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и желудка (таблица 3). У больных 2 группы обнаружено увеличение показателей протеиназ (2,5-3,5 раза) и ингибиторов (в 2-2,5 раза) в подгруппах 2Б, 2В, причем максимальные значения наблюдались при эрозивном гастродуодените (2Б). При субатрофическом поражении слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки выявлено снижение протеиназ и α_2 -МГ при нормальном уровне α_1 -АТ у больных 2Г и 4Г. В подгруппах 4А, 4Б, 4В уровни протеиназ были повышены в среднем в 3-5 раз и α_2 -МГ в 2,5 раза (таблица 3) в то время, как показатель активности α_1 -АТ выявлялся в пределах нормы. Таким образом максимальные показатели активности протеиназ и ингибиторов обнаружены при эрозивном гастродуодените и минимальные при субатрофии, что свидетельствует о корреляции уровня ферментов с морфологическими изменениями слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. У больных 4 группы выявлено истощение ингибиторного потенциала крови по сравнению с больными 2 группы.

Проанализированы изменения коэффициента ТПА2/ α_1 -АТ в разные стадии заболеваний (обострение, неполной клинической ремиссии, полной ремиссии (таблица 1, 2). Отсутствие изменений средних значений данного коэффициента (по сравнению с контролем) у больных 2 группы позволяет сделать заключение о сбалансированности сдвигов системы протеиназы-ингибиторы на начальных стадиях развития

Таблица 3. Показатели протеолиза в зависимости от эндоскопической картины слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки (в стадии обострения).

Форма поражения слизистой	ХПА нмоль/мин·мл	ТПА1 нмоль/мин·мл	ТПА2 нмоль/с·л	α_1 -АТ мкмоль/с·л	α_2 -МГ мкмоль/с·л
2А (n=14)	1,4 \pm 0,04	77,9 \pm 0,15	208,1 \pm 1,6	22,3 \pm 0,4	1,6 \pm 0,05
2Б (n=7)	1,36 \pm 0,09	102,4 \pm 2,9	240,6 \pm 4,5	26,3 \pm 1,3	2,1 \pm 0,06
2В (n=5)	1,14 \pm 0,05	89,9 \pm 1,7	210,6 \pm 4,8	20,5 \pm 0,5	1,8 \pm 0,07
2Г (n=4)	0,21 \pm 0,07	10,2 \pm 0,7	44,9 \pm 2,9	9,2 \pm 0,4	0,21 \pm 0,09
4А (n=3)	2,35 \pm 0,05	148,5 \pm 3,4	250,6 \pm 5,4	10,7 \pm 0,3	2,4 \pm 0,09
4Б (n=4)	2,5 \pm 0,09	164,5 \pm 4,7	261,4 \pm 3,8	11,2 \pm 0,3	2,6 \pm 0,06
4В (n=2)	1,85 \pm 0,07	156,8 \pm 3,2	253,5 \pm 4,2	9,2 \pm 0,4	2,45 \pm 0,09
4Г (n=3)	0,25 \pm 0,06	15,2 \pm 2,6	59,2 \pm 1,2	9,15 \pm 0,1	0,45 \pm 0,03
Контроль (n=20)	0,43 \pm 0,04	28,3 \pm 1,5	64,1 \pm 3,1	9,2 \pm 0,8	0,9 \pm 0,3

Результаты представлены как $M \pm m$. В скобках дано количество проанализированных историй болезни. Различие значений статистически достоверно ($p < 0,01$).

воспалительного процесса слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Достаточное увеличение при этом средней активности α_1 -АТ наряду с уровнем ТПА2 в стадию обострения процесса и при длительности заболевания до 5 лет отражает компенсаторные возможности организма (таблица 2). У больных 3 группы выявлено увеличение этого коэффициента, при этом отмечена прямая зависимость этого показателя со сроком заболевания. У больных с длительностью заболевания более 5 лет он составил 95 по сравнению с контролем - 6,96. Сходные изменения выявлены в группах 4 и 5 (таблица 2). Увеличение этого коэффициента у больных язвенной болезнью и при сочетанной патологии в стадию обострения и четкая связь со сроком заболевания может рассматриваться как свидетельство существенного дефицита ингибиторного потенциала.

Повышение активности α_2 -МГ в стадии обострения наряду с повышением активности протеиназ объясняется компенсаторным выбросом ингибитора в ответ на увеличение протеолитической активности крови.

У всех больных 1 группы изменений в системе протеиназы-ингибиторы не обнаружено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при функциональных изменениях желудка и двенадцатиперстной кишки система протеиназы-ингибиторы находится в устойчивом состоянии. Нарастание изменений слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, увеличение срока заболевания (более 5 лет) и

присоединение хронического колита приводят к выраженному дисбалансу в этой системе, особенно у больных с эрозивным гастродуоденитом и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. По всей видимости истощение ингибиторного потенциала крови и как результат высокая протеолитическая активность ферментов приводят к деструктивным изменениям в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, следовательно имеют патогенетическое значение при развитии гастродуоденита и язвенной болезни и влиянии на прогноз заболевания. Поэтому необходимо своевременное выявление дефицита ингибиторного потенциала и разработка наиболее эффективных способов коррекции этих нарушений под контролем ферментов сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Веремеенко К.Н., Голобородько О.Л., Кизим А.И. (1988), Киев.
2. Чесноков Н.Г. (1978) Физиология и патология органов пищеварения. Труды Крымского Гос. Мед. Инст., 76, 44-47.
3. Опарин А.Г., Газизов Р.М. (1976) Казан. мед. журнал, 4, 314-317.
4. Sawston T.F. (1995) Br. Med. Bull., 51(2), 385-401.
5. Купцова Н.Н., Сирота А.В., Пинзур Е.Д., Рыжкова Л.А. (1980) Вопросы питания, 4, 314-317.
6. Пелов Э.Я. (1979) Автореферат Дисс. канд. мед. наук, Астрахань.
7. Ревуцкая А.Е. (1975) Автореферат Дисс. канд. мед. наук, Киев.
8. Чумакова О.В. (1995) Автореферат Дисс. канд. мед. наук, Москва, 34-36.
9. Карягина И.Ю., Зарембский Р.А., Балябина М.Д. (1990) Лаб. дело, №2, 10-13.
10. Мазурин А.В., Гуляев Г.К., Запруднов А.М. (1981) Вопр. охр. матер. и дет., 26, 7, 24-29.
11. Heimbürger N., Haupt H., Schwick H.G (1971). Proc.of Int. Res. Conf. Prot. inhibitors, New York, 1-24.
12. Тарасенко И.А. (1975) Автореферат Дисс. канд. мед. наук, Ташкент, 19с.

CLINICAL ANALYSIS OF PROTEINASES AND INHIBITORS AT CHILDREN WITH GASTROENTEROLOGICAL DISEASES.

O.B.DOVGUN¹, L.T. TEBLOEVA¹, N.K. SCHUMEIKO¹, G.N. RUDENSKAYA²

¹Moscow Medical Stomatological Institute, ²Moscow State University
fax (7 - 095) 939-31-81, E-mail: Rudenskaya @ biorg. chem. msu. Su

The aim of this study was to determine trypsin-like proteinase activity, chymotrypsin-like proteinase activity, trypsin, α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin levels in blood serum at the children with gastroenterological pathology. These parameters did not change at the children with functional disorder of stomach and duodenum. The stable balance between proteinases and inhibitors was determined only at the duration of the disease not more 5 years. The absence of normal levels these enzymes after traditional treatment was explain the necessity to continue the therapy at home with control of enzymes' levels.

Key words: proteases, protease inhibitors, blood serum, gastroenterological pathology.