

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ, МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 616.37-002:612.015
© Коллектив авторов

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА

В.В. Шабанов, М.Н. Милякова, Н.Н. Сарбаева

Самарский военно-медицинский институт, кафедра-клиника хирургии
443099, г.Самара, ул.Пионерская, 22; факс: (8462) 37-11-22, 34-11-28;
эл.почта: sjuris@rs34.ssau.ru

При определении эстеразной активности трипсина в сыворотке крови по методу Erlanger происходит завышение показателей вследствие помутнения инкубационной среды, не связанное с гидролизом субстрата. Предложенная В.А. Шатерниковым поправка, основанная на использовании двухволнового метода, полностью не устраняет этот побочный фактор.

Для просветления растворов предлагается останавливать реакцию погружением пробирок в лёд, с последующим центрифугированием исследуемых проб при 0° С в течение 15 минут при 25 000 g, что даёт возможность измерять истинный прирост оптической плотности за счёт гидролиза субстрата.

Представлены результаты измерения эстеразной активности трипсина в сыворотке крови и перитонеальном экссудате собак с острым экспериментальным панкреатитом. У интактных животных истинная эстеразная активность трипсина в сыворотке крови не выявлялась; через 3-4 часа после моделирования заболевания у двух из 7-ми особей она не превышала 3,6 мкмоль/(мин·л), а у остальных - отсутствовала.

При остром панкреатите у крыс эстеразная активность трипсина крови также была очень низкой ($0,38 \pm 0,16$ мкмоль/(мин·л)) и статистически не отличалась от показателей контрольных животных. Высказано сомнение в целесообразности применения этого метода для диагностики острого панкреатита, поскольку эстеразную активность проявляет только комплекс трипсин- α -2-макроглобулин, содержание которого в крови не превышает 10% от общего количества связанного с антипротеазами трипсина.

Эстеразная активность трипсина, обнаруживаемая в крови и перитонеальном экссудате, не свидетельствует о его протеолитической активности, что подтверждено данными эксперимента, полученными при введении в среду соевого ингибитора трипсина.

Ключевые слова: эстеразная активность трипсина, острый панкреатит.

ВВЕДЕНИЕ. Центральным событием в патогенезе острого панкреатита (ОП) любой этиологии в настоящее время считается внутриклеточная активация трипсиногена вследствие отщепления от него пептида активации с образованием свободного трипсина, обладающего протеолитической активностью. Неудивительно, что многие исследователи стремятся обнаружить трипсин в крови и других биологических жидкостях с целью диагностики ОП [1-4].

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПСИНА

В крупных исследовательских центрах США и Европы количество трипсина в сыворотке крови измеряют радиоиммунным методом (с использованием моноклональных антител к антигенным детерминантам молекулы фермента). Радиоиммунный метод является наиболее точным, однако дорог и требует специально оборудованных лабораторий.

Определение содержания трипсина биохимическими методами основано либо на регистрации протеолитической активности фермента с использованием белковых и пептидных субстратов, либо на способности трипсина к гидролизу эфирной связи синтетических амидов (эстеразная активность). Методы, основанные на выявлении эстеразной активности трипсина, нашли наиболее широкое применение в связи с их относительной простотой и доступностью [5-7].

Следует отметить, что метод, основанный на выявлении эстеразной активности трипсина, был разработан в 1961 году Erlanger для определения препаративно выделенного очищенного трипсина в водных растворах, содержащих только компоненты солевых буферных систем [7]. В основу метода положена химическая реакция, в ходе которой от бесцветного субстрата N- α -бензоил-L-аргинин-паранитроанилида (БАПНА) или других синтетических амидов отщепляется паранитроанилин, имеющий желтую окраску (светопоглощение на длине волны 410 нм). Сфера применения этого метода ограничивалась специальными фармакологическими и биохимическими исследованиями. Однако впоследствии он был положен в основу модификаций, распространяющих его применение на биологические жидкости (сыворотку крови, перитонеальный экссудат и т.д.).

Известно, что наличие широкого спектра ингибиторов сериновых протеаз, к которым относятся ингибиторы Кунитца и Казеля панкреоцитов [8], α -1-антитрипсин и α -2-макроглобулин крови и тканевой жидкости, приводит к тому, что трипсин, вышедший из разрушенных клеток, находится исключительно в комплексе с каким-либо из тканевых или сывороточных ингибиторов [9]. Содержание антипротеаз в крови очень высоко: концентрация α -1-антитрипсина, например, составляет 1,34-2,5 г/л, α -2-макроглобулина - 1,5-4,2 г/л [10]. Ни в одном исследовании не было зарегистрировано состояние больного или подопытного животного, при котором запасы сериновых протеаз крови были бы полностью истощены и их антипротеазная активность равнялась нулю [11,12]. При этом трипсин, связанный с α -1-антитрипсином, является метаболически инертным, а находящийся в комплексе с α -2-макроглобулином, хотя и не проявляет протеолитической активности, но способен как эстераза катализировать расщепление эфирной связи в синтетических амидах [13]. Именно этот комплекс трипсин- α -2-макроглобулин и может быть определен в крови и других биологических средах по его эстеразной активности.

Можно привести длинный список работ, в которых документируется многократное увеличение эстеразной активности трипсина у больных ОП (как правило, при применении метода Erlanger в модификации Шатерникова [6]). Мы также попытались использовать этот метод для контроля за динамикой ОП в эксперименте на животных, но обратили внимание на то, что в ходе реакции помимо желтого окрашивания происходит выраженное помутнение растворов. В.А.Шатерников указывал на возможное развитие мутности и предлагал убирать мешающее действие этого фактора двухволновым методом, однако не привел убедительных доказательств эффективности данного способа. В методике, прилагаемой к наборам для определения трипсина фирмы "Лахема", устранение мутности вообще не предусмотрено.

Целью нашей работы являлась оценка погрешности, возникающей вследствие измерения оптической плотности мутных растворов, и модификация метода Erlanger таким образом, чтобы наиболее полно устранить данный побочный фактор среды при работе с сывороткой крови и перитонеальным экссудатом.

МЕТОДИКА. Эксперименты выполнены на 7-ми собаках и 19-ти крысах. Модель ОП у собак создавали введением смеси консервированной желчи с 15%-ым раствором этилового спирта в соотношении 1:5 из расчета 0,5 мл на кг веса животного в главный проток поджелудочной железы. В течение последующих 3-х часов каждый час в периферической венозной крови определяли содержание липазы и трипсина. Через 3 часа из брюшной полости аспирировали экссудат, иссекали кусочки железы для гистологического исследования и животное умерщвляли. ОП у крыс моделировали как описано ранее [14], кровь забирали на следующие сутки.

В качестве базовых были выбраны методы определения эстеразной активности по Erlanger [7] и Шатерникову [6].

Метод определения активности трипсина по Erlanger.

Реактивы: 1) субстратная смесь - 1 мМ БАПНА, предварительно разведенной в диметилсульфоксиде, и 0,02 М CaCl_2 на 0,05 М трис-буфере с pH 8,2; 2) 30%-ая уксусная кислота.

Ход определения. В контрольную и опытную пробирки, содержащие по 5 мл субстратной смеси, добавляют 0,9 мл H_2O (конечная концентрация БАПНА 0,83 мМ), прогревают в термостате при 25°C в течение 5 минут. В опытную пробирку вносят 0,1 мл исследуемой пробы, выдерживают при 25°C обе пробирки 30 минут, после чего в контрольную пробирку также добавляют 0,1 мл сыворотки. Реакцию останавливают добавлением 1 мл раствора уксусной кислоты, измеряют оптическую плотность опытной пробы против контрольной при длине волны 410 нм.

Erlanger предложил также быстрый кинетический метод определения активности трипсина, при котором реакция проводится в кювете спектрофотометра с регистрацией оптической плотности через 5 минут без добавления останавливающего раствора. Расчет активности проводят по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \times P \times 1000}{t \times K}$$

где ΔE - прирост оптической плотности при 410 нм,

P - конечное разведение сыворотки в кювете спектрофотометра,

1000 - коэффициент пересчета на 1 л,

t - время инкубации,

K - оптическая плотность стандартного раствора (1 мМ) нитроанилина.

Получаемая активность выражается в микромолях высвобождающегося при гидролизе БАПНА p-нитроанилина на 1 л исследуемого раствора в минуту.

Метод Erlanger в модификации В.А. Шатерникова.

Реактивы: 1) 0,46 мМ раствор БАПНА, предварительно разведенного в диметилформамиде, на 0,05 М вероналовом буфере pH 8,2; 2) 0,14 М раствор NaCl.

Ход определения. В опытную и контрольную пробирки вносят по 0,25 мл сыворотки крови, добавляют по 0,25 мл раствора 0,14 М NaCl и по 4 мл раствора субстрата. В контрольную пробирку добавляют 0,5 мл 0,5 М раствора HCl (конечная концентрация БАПНА в обеих пробирках 0,41 мМ). Инкубируют 30 мин при 37°C, после чего в опытную пробирку добавляют 0,5 мл 0,5 М раствора HCl. Измеряют оптическую плотность контрольной и опытной проб при длине волны 410 нм. Для поправки на помутнение проб повторно определяют оптическую плотность при длине волны 550 нм.

Расчет активности:

$$A = \frac{(\Delta E_{410} - \Delta E_{550}) \times P \times 1000}{t \times K}$$

где ΔE_{410} - прирост оптической плотности при 410 нм,

ΔE_{550} - прирост оптической плотности при 550 нм,

P - конечное разведение сыворотки в кювете спектрофотометра,

1000 - коэффициент пересчета на 1 л,

t - время инкубации,

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПСИНА

К - оптическая плотность стандартного раствора (1мкМ) *p*-нитроанилина.

При выполнении исследований по обеим приведенным выше методикам обращает на себя внимание быстрое нарастание мутности инкубационной смеси после внесения образца сыворотки, особенно существенное в среде, в состав которой входит хлорид кальция. Чтобы устранить мутность, мы ввели в методику дополнительный этап - центрифугирование при низкой температуре. С учетом низкой концентрации трипсина в биологических жидкостях реакцию проводили не при 25°C, а при 37°C, и концентрацию БАПНА снизили вдвое, как предложено В.А. Шатерниковым.

Предлагаемая модификация метода Erlanger.

Субстратная смесь: растворить 3,26 мг БАПНА в 0,2 мл диметилформамида или диметилсульфоксида, довести объем раствора 0,05 М ТРИС-буфером pH 8,2, содержащим 0,02 М CaCl₂, до 5 мл.

Ход определения. В опытную и контрольную пробирки внести по 1,9 мл буфера и 1 мл субстратной смеси (конечная концентрация БАПНА 0,5 мМ) и выдержать при 37°C в течение 10 минут. В опытную пробирку добавить 0,1 мл сыворотки крови. Инкубировать пробы в течение 20 минут, а затем остановить реакцию погружением пробирок в лед. В контрольную пробу добавить 0,1 мл сыворотки крови. Центрифугировать пробирки при 0°C, 25 000 g в течение 15 минут. Отобрать супернатант и определить оптическую плотность опытной пробы против контрольной при длине волны 410 нм. Расчет производить по формуле оригинального метода Erlanger.

Для ответа на вопрос обладает ли обнаруживаемый в сыворотке крови и перитонеальном выпоте трипсин протеолитической активностью, в инкубационную среду добавляли соевый ингибитор трипсина (СИТ) в конечной концентрации 5 мкМ, в связи с которым трипсин не способен к гидролизу эфирной и амидной связей [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. У всех собак диагноз "острый панкреатит" подтвержден гистологически. Активность липазы крови через 3 часа после введения в проток желчи составила 167 - 890 мкмоль/(мин·л) при норме 0 - 20 мкмоль/(мин·л). Данные, подтверждающие наличие ОП у крыс, приведены ранее [14].

Сравнение результатов измерения активности трипсина в сыворотке крови кинетическим методом Erlanger с результатами, полученными по предлагаемой нами модификации, показало существенные различия между ними (табл. 1).

Таблица 1. Сравнение результатов определения активности трипсина кинетическим методом Erlanger и предлагаемой нами модификацией метода в сыворотке крови у собак с ОП

Продолжительность острого панкреатита, час	Активность трипсина, мкмоль/(мин·л)	
	Метод Erlanger (n=7)	Наша модификация (n=7)
0 ч	11,77±1,17	0±0
1 час	18,82±1,58*	0±0
2 часа	25,61±4,46*	0±0
3 часа	29,10±5,47*	0,88±0,394**

* $p < 0,05$ ** при добавлении СИТ 0,89±0,373

По оригинальному методу активность трипсина определялась в сыворотке крови у животных с интактной поджелудочной железой, а при развитии ОП-возрастала в течение всего периода наблюдения, достигая средней величины 29,10 мкмоль/(мин·л), что более, чем в 2 раза превысило начальный уровень. При использовании модификации метода с устранением мутности центрифугированием при низкой температуре эстеразная активность трипсина определялась только в 2-х из 7-ми случаев. Проведенные эксперименты

продемонстрировали, что измеряемая "активность трипсина", по сути, является следствием измерения степени помутнения растворов, а не изменения их цветности. В разработанной нами модификации, когда мутность проб полностью удалялась центрифугированием при 0°C, измерение оптической плотности опытных проб против контрольных при 410 нм показало истинный прирост концентрации нитроанилида, обусловленный гидролизом субстрата ферментом.

При параллельном определении изменения оптической плотности инкубационной смеси, содержащей один и тот же образец сыворотки крови от собаки с ОП (3 часа) при двух длинах волн - 410 нм (максимум поглощения нитроанилида) и 340 нм (принята для нефелометрии), мы получили следующие приросты оптической плотности: 0,109 единиц оптической плотности за 5 минут инкубации при 410 нм и 0,097 единиц оптической плотности при 340 нм. Отсутствие избирательности светопоглощения в зависимости от длины волны также подтверждает, что при использовании кинетического метода Erlanger фактически производится нефелометрическое определение нарастания мутности инкубационной смеси, а не измерение содержания *p*-нитроанилина - продукта гидролиза синтетического субстрата.

Чтобы выяснить причину нарастания оптической плотности, было проведено параллельное измерение её нарастания в пробах: 1) содержащих стандартную инкубационную смесь и 2) содержащих инкубационную смесь без субстрата, но с диметилсульфоксидом (растворитель БАПНА) в стандартном соотношении к объему инкубационной смеси (исследуемый материал - сыворотка собаки с ОП, как в предыдущем опыте). Оказалось, что в среде без субстрата прирост оптической плотности за 5 мин инкубации был таким же, как в среде, содержащей субстрат - 0,111 ед. и 0,109 ед. соответственно, а "активность" трипсина в среде, не содержащей БАПНА, составила 77,6 мкмоль/(мин·л). Приведенные результаты показывают, что нарастание мутности пробы обусловлено не работой фермента, а взаимодействием других компонентов инкубационной смеси, скорее всего, растворителя БАПНА - диметилсульфоксида и ионов кальция с липидно-белковыми компонентами сыворотки крови. Поскольку при ОП в крови возрастает количество жирных кислот вследствие чрезвычайно высокой активности панкреатической липазы, при определении "активности" трипсина наблюдается относительно более высокое, чем в контроле, нарастание мутности инкубационной среды. Исследовав кровь собак с ОП по предлагаемой методике, мы установили, что эстеразная активность трипсина сыворотки через 3 часа оказалась весьма низкой - $0,88 \pm 0,394$ мкмоль/(мин·л). У двух из 7-ми животных она составила 2,57 и 3,6 мкмоль/(мин·л), у остальных была равна 0, несмотря на наличие очагов некроза в поджелудочной железе у всех животных. В крови собак, взятой до моделирования ОП, активность трипсина отсутствовала. Приблизительно такая же активность трипсина у собак с ОП определялась и в перитонеальном выпоте (0 - 15,4 мкмоль/(мин·л)). Достаточно высокий показатель - 52,9 мкмоль/(мин·л) - был обнаружен только у одного животного.

При моделировании ОП у крыс определение активности трипсина в сыворотке крови выполнялось 4-мя методами: по Erlanger (кинетическим и с использованием конечной точки), модификацией метода Erlanger по В.А. Шатерникову и нашей модификацией метода Erlanger (табл. 2). Очевидно, что внесение раствора уксусной кислоты для остановки реакции и использование двух длин волн снижают погрешность, вызванную помутнением растворов, но не устраняют ее полностью. Данные, полученные с применением центрифугирования при охлаждении до 0°C, значительно уменьшили показатели измеряемой ферментативной активности. Как видно из таблицы, истинная эстеразная активность трипсина сыворотки крови крыс в 3-20 раз ниже получаемой по методам В.А.Шатерникова и Erlanger. Ни одним из использованных методов повышения активности трипсина у животных с ОП, по сравнению с контрольными животными, не обнаружено.

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПСИНА

Таблица 2. Активность трипсина в крови крыс, определяемая различными модификациями метода Erlanger, мкмоль/(мин·л)

Исследуемый материал	Методы			
	Erlanger кинетический	Erlanger по конечной точке	Erlanger в модификации В.А.Шатерникова	Наша модификация
Сыворотка крови интактных крыс, (n=11)	6,01±1,42	3,61±0,42	3,02±0,59	1,05±0,35
Сыворотка крови крыс с ОП, (n=8)	7,60±0,66	2,71±0,26	3,75±0,50	0,38±0,16

Для выяснения обсуждаемой в литературе возможности протеолитического действия связанного в крови с α -2-макроглобулином трипсина, был выполнен тест с соевым ингибитором (табл. 3). Отсутствие эффекта при внесении СИТ свидетельствует о том, что трипсин, находящийся в связанном состоянии, не способен к гидролизу пептидной связи белков.

Таблица 3. Эффект внесения в инкубационную среду СИТ на активность трипсина в сыворотке крови крыс с ОП

Метод определения активности трипсина	Активность трипсина, мкмоль/(мин·л)	
	Без СИТ	С добавлением СИТ
Erlanger по конечной точке	2,71±0,26	2,68±0,21
Собственная модификация	0,38±0,16	0,39±0,15

Приведенные данные показывают, что величины активности трипсина, представленные в ряде отечественных литературных источников, сильно завышены. Для измерения истинной эстеразной активности требуется устранение мутности растворов, что может быть сделано при помощи центрифугирования при низкой температуре. Однако при использовании этого метода в клинической практике всегда следует помнить, что эстеразная активность трипсина будет зависеть не столько от количества фермента, поступившего в кровоток, сколько от концентрации комплекса трипсин- α -2-макроглобулин, содержание которого у человека не превышает 10 % от всего количества связанного с антипротеазами трипсина [8]. Тем более, выявление эстеразной активности трипсина в сыворотке крови не может быть основанием для лечения больного ОП фармацевтическими препаратами, содержащими ингибиторы протеаз. Неэффективность антипротеазной терапии при ОП подтверждена рядом клинических исследований [11].

В настоящее время в экспериментальных работах для определения содержания в крови пептида активации широко используется метод ИФА [16,17]. Он позволяет очень точно установить количество трипсиногена, прошедшего активацию внутри ацинарных клеток, но редко используется в клинике для диагностических целей из-за слишком высокой стоимости анализа при обследовании одного пациента.

Для диагностики ОП в клинических условиях можно использовать быстрый и достаточно информативный метод определения активности панкреатической липазы в сыворотке крови [18]. Этот простой и дешевый (стоимость реактивов для обследования одного больного не превышает 0,65 доллара США) метод [19] хорошо зарекомендовал себя в практике работы клиник Самарского военно-медицинского института, где он успешно применяется в течение последних лет для обследования больных с подозрением на ОП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вашетко Р.В., Толстой А.Д., Курыгин А.А. и др. (2000) Острый панкреатит и травмы поджелудочной железы: руководство для врачей. СПб, Питер, 320 с.
2. Костюченко А.Л., Филин В.И. (2000) Неотложная панкреатология: справочник для врачей. СПб, Деан.

3. *Отлыгин Ю.В.* (1992) Особенности патогенеза, диагностики, клинического течения и лечения панкреатогенного шока. Дис. ... канд.наук. Москва, 251 л.
4. *Трухан Д.И., Полуэктов В.Л.* (2000) Вестн. хирургии, **159**(1), 17 - 20.
5. *Асатиани В.С.* (1969) Ферментные методы анализа. Москва, Наука, 740с.
6. *Покровский А.А.* (ред) (1969) Биохимические методы исследования в клинике. Справочник. Москва, Медицина.
7. *Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W.* (1961) Arch. Biochem, **95**, 271-278.
8. *Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И.* (1988) Протеолиз в норме и при патологии. Киев, Здоров'я.
9. *Логинев А.С., Амиров Н.Ш., Черноярлова Л.Д.* (1982) Физиологический журн., **68**(5), 692 - 698.
10. *Туз Н.У.* (ред) (1997) Энциклопедия клинических лабораторных тестов (N.W. Tietz). Москва, Лабинформ.
11. *Berling R., Borgstrom A., Ohlsson K.* (1998) Int. J. Pancreatol, **24**(1), 9-17.
12. *Kruse P., Hage E., Lasson A.* (1999) Int. J. Pancreatol, **25**(2), 113-121.
13. *Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С.* (1979) Вопр. мед. химии, **25**(4), 494-499.
14. *Шабанов В.В., Сарбаева Н.Н., Милякова М.Н.* (2001) Бюл. экспер. биол, **132**(8), 167 - 169.
15. *Raraty M., Ward J., Erdemli G et.al.* (2000) Proc.Natl.Acad Sci, **97**(24), 13126-13131.
16. *Grady T., Mc Moud M., Otani T., et all.* (1998) Am. J. Physiol. Gastroent. Liver Physiol, **275**(5), 1010-1017.
17. *Mayer J., Rau B., Schoenberg M. H., Beger H.G.* (1999) Hepatogastroenterology, **46**(29), 2757 - 2763.
18. *Mergener K., Baillie J.* (1998) Br.Med.J., **316**(3), 44-48.
19. *Карпищенко А.И.* (ред) (1999) Медицинские лабораторные технологии. Справочник. Т.2. Санкт-Петербург, "Интермедика".

Поступила

MODIFICATION OF METHOD OF DETERMINATION OF ESTERASE ACTIVITY OF TRYPSIN IN BLOOD SERUM.

Shabanov V.V., Miljakova M.N., Sarbaeva N.N.

Samara Military Medical Institute, Surgical Clinics, Samara
Russia, 443099, 22 Pionerskaja Street.
fax: (8462) 37-11-22, 34-11-28; e-mail: sjuris@rs34.ssau.ru

Determination of esterase activity of trypsin in blood serum using the Erlanger's method leads to overestimation of enzyme activity due to the increased "dimness" of the reaction medium. V. A. Shaternikov suggested a correction, which is based on the use of the two-wavelength registration method. But this correction does not eliminate this secondary factor completely.

So for the clearing of the solutions we offer to stop the reaction by putting tubes into ice followed by subsequent centrifugation the investigated samples at 0° C for 15 min, at 25,000 g. It gives the possibility to measure an actual increase of an optical density in accordance to the hydrolysis of the substrate.

The results of the measuring of an esterase activity of trypsin are represented in a serum and in a peritoneal exudate of dogs with an acute experimental pancreatitis. The serum esterase activity of trypsin in a was not found in intact animals. Three hours after induction of pancreatitis trypsin activity was detected only in blood serum of two of seven animals [~ 3.6 mmole/(min·l)].

Rats with acute pancreatitis also had very low esterase activity of trypsin in blood [0.38 ± 0.16 mmole/(min·l)] that insignificantly deferred from the control. These data question applicability of this method for diagnostics of acute pancreatitis. The esterase activity of trypsin detected in blood and peritoneal exudate, does not indicate its proteolytic activity, because it was insensitive to soybean trypsin inhibitor.

Key words: esterase activity of trypsin, pancreatitis.