

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.014.464:616.37-074

©Ефременко

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ - ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ КРИТЕРИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ

Ю.Р. Ефременко

Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород,
603005 Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1; тел.: (8312) 377407;
факс: (8312) 390314; эл. почта: julia_lisina@mail.ru

Изучали действие озонированного физиологического раствора на протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, эластаза, калликреин, лейцинаминопептидаза), ингибиторы протеолиза и перекисное окисление липидов (ПОЛ). Введение озона приводило к выраженной ответной реакции системы протеолиза. Низкие дозы озона не вызывали активации протеолитических ферментов, высокие - активировали протеиназы, снижали уровень ингибиторов протеолиза (α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина) и стимулировали накопление продуктов ПОЛ. В связи с этим, определение активности протеолитических ферментов можно предложить как индикатор эффективности и безопасности озонотерапии и других лечебных программ.

Ключевые слова: озон, трипсин, калликреин, эластаза, поджелудочная железа.

ВВЕДЕНИЕ. К числу фундаментальных достижений биологии последних лет относится признание протеолиза как особой формы физиологической регуляции. Регуляторная роль протеолитических ферментов заключается в деградации аномальных, мутировавших белковых структур [1-3], а также в образовании и модификации гормонов, ферментов, физиологически активных пептидов [4, 5]. Таким образом, протеолиз контролирует концентрацию и качество основных биорегуляторов, от функционирования которых, по существу, зависит весь характер метаболизма.

Среди факторов, воздействующих на активность протеолитических ферментов, особого внимания заслуживают соединения с высоким окислительным потенциалом. К таковым относится озон, широко применяющийся в клинической практике [6, 7]. Влияя на окислительно-восстановительное состояние клетки, озон принимает участие и в регуляции внутриклеточных метаболических процессов [8]. Кроме того, в условиях окислительного воздействия существует опасность чрезмерной активации системы протеолиза и свободно-радикальных процессов. В связи с этим перспективным представляется изучение состояния системы протеолиза в ответ на введение озона в составе физиологического раствора.

Цель исследования - оценить эффект воздействия озонированного физиологического раствора на состояние системы протеолиза.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили на 242 белых нелинейных крысах самцах, массой 200-220 г. Животным вводили внутрибрюшинно 1 мл озонированного физиологического раствора (ОФР). Биохимические анализы проводили в плазме крови, гомогенатах тканей поджелудочной железы (ПЖ) и

дистального отдела тонкого кишечника. Во всех исследуемых тканях определяли: активность трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеиназ, эластазы, лейцинаминопептидазы (ЛАП), калликреина [9], активность основных ингибиторов протеолиза α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина [10], а также интенсивность индуцированной хемилюминесценции и уровень молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) - диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа [11]. Активность протеиназ определяли по схеме [12]. Трипсиноподобную активность определяли при помощи N- α -бензоил-аргинин-паранитроанилин (БАПНА) в качестве субстрата. Исследование химотрипсиноподобной активности проводили при помощи субстрата Glp-Phe-pNa, для определения эластазы использовали Z-Gly-Ala-Ala-pNa, протеолитическую активность калликреина выявляли по субстрату Z-D-Ala-Leu-Arg-pNa, лейцинаминопептидазы - при помощи субстрата Leu-pNa. Синтетические хромогенные субстраты предоставлены Рос НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (г. Москва).

Результаты опытов обработаны статистически, вычислены средние арифметические \pm ошибки средних, достоверность различий между группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Введение ОФР с невысокими дозами озона (0,027–0,505 мкг) оказывает положительные эффекты на системы протеолиза и ПОЛ. Во-первых, потенцируя процессы перекисидации сразу после окислительного воздействия, по типу реакций обратной связи, озон активирует антиоксидантное звено защиты организма животного. Во-вторых, отмеченное повышение активности α_2 -макроглобулина в 1,3 раза ($p < 0,05$) может свидетельствовать о включении компенсаторных механизмов, запускающих физиологические процессы адаптации. И в-третьих, не выявлено достоверных изменений активности всех исследуемых протеиназ.

Однако более высокие дозы озона вызывают разобщение в функционировании системы ПОЛ – оАОА с превалированием прооксидантных процессов. Одновременно выявлено повышение протеолитической активности в исследуемых объектах со снижением ингибиторного потенциала плазмы крови.

По данным Бобыревой [13], избыточное образование свободных радикалов в ткани поджелудочной железы нарушает гидрофобные связи макромолекул, белки β -клеток денатурируют и становятся антигенами для собственной иммунной системы. Повышенная чувствительность β -клеток к действию АФК обусловлена еще и тем, что в них снижена активность антиоксидантных защитных систем [13-15]. Однако следует подчеркнуть, что повреждающее действие АФК реализуется разными путями. С одной стороны, АФК в высокой концентрации могут прямо повреждать клетки за счет активации ПОЛ; с другой, – нарушать баланс в системе протеолиз – антипротеолиз.

В наших исследованиях при введении ОФР с дозой озона 3,03 мкг отмечена активация трипсина в 9 раз по сравнению с интактной серией животных ($p < 0,001$) в тканях поджелудочной железы (табл. 1). Трипсин, являясь активатором основных панкреатических ферментов, далее запускает весь каскад протеолитических энзимов. Активация химотрипсиноподобных протеиназ в 1,6 раза ($p < 0,001$) и эластазы в 1,8 раза ($p < 0,001$) подтверждает это. Дальнейшее поступление панкреатических ферментов в кровь, особенно эластазы [16], рассматривается как первичный фактор агрессии при развитии панкреатита. За этим следует активация (с участием все того же трипсина) ККС крови и тканей с выбросом значительного количества вторичных факторов агрессии – свободных кининов. Известно, что калликреины играют роль медиаторов аллергических и воспалительных процессов, участвуют в регуляции микроциркуляции, артериального давления, коагуляции [17, 18]. Активность основного фермента ККС – калликреина в поджелудочной железе увеличилась в 4,6 раза ($p < 0,001$). В то же время в плазме крови активация была менее выраженной – в 1,4 раза ($p < 0,001$).

Таблица 1. Изменения активности протеолитических ферментов на фоне введения ОФР с дозой озона 3,033 мкг (в нмоль/мл·мин).

Ткань	Трипсин	Химотрипсин	Эластаза	Каликреин	Лейцинамино-пептидаза
ПЖ (инт) (n=9)	6,22±0,05	5,94±0,08	3,73±0,02	6,84±0,55	4,44±0,12
Пл (инт) (n=9)	8,25±0,03	2,06±0,05	2,84±0,05	5,04±0,06	7,41±0,12
ПЖ (n=18)	57,60±0,54*	9,57±0,05*	6,77±0,04*	31,17±0,16*	9,21±0,11*
Пл (n=18)	9,46±0,27*	2,57±0,08*	4,56±0,14*	6,97±0,08*	10,67±0,13*

Примечание: * - достоверные различия относительно интактной серии ($p<0,001$); ПЖ – поджелудочная железа, Пл – плазма крови, инт – интактная серия животных.

Активность связующего фермента между ККС и РААС – лейцинаминопептидазы (ЛАП) – также повышалась в ткани поджелудочной железы в 2 раза по сравнению с интактной группой животных ($p<0,001$) (табл. 1). Повышение активности ЛАП, последующая активация ангиотензинпревращающего фермента, а, следовательно, и образование ангиотензина II, в свою очередь, может привести к инактивации брадикинина, вазоконстрикции сосудов и, соответственно, к повышению артериального давления [18-22].

В то же время, при введении дозы озона 5,99 мкг, ожидаемого дальнейшего повышения протеолитической активности в исследуемых тканях не наблюдалось. Активность протеиназ оставалась на уровне интактных значений. В связи с этим наиболее ценная информация получена при изучении ферментов в плазме крови, где выявлено достоверное повышение активности всех исследуемых протеолитических ферментов (табл. 2).

Таблица 2. Изменения активности протеолитических ферментов на фоне введения ОФР с дозой озона 5,99 мкг (в нмоль/мл·мин).

Ткань	Трипсин	Химотрипсин	Эластаза	Каликреин	ЛАП
ПЖ (инт) (n=9)	6,24±0,05	6,43±0,08	1,73±0,02	4,12±0,24	1,73±0,12
Кишечник (инт) (n=9)	14,88±0,06	3,73±0,05	1,56±0,04	4,30±0,10	4,40±0,12
Плазма (инт) (n=9)	4,68±0,07	2,56±0,07	2,38±0,11	1,54±0,06	4,41±0,12
ПЖ (n=18)	8,41±0,04*	8,18±0,05*	1,62±0,04	4,22±0,09	1,97±0,04*
Кишечник (n=18)	17,51±0,14*	3,80±0,08	1,67±0,05**	4,60±0,08**	4,19±0,07
Плазма (n=18)	9,17±0,05*	3,51±0,06*	3,58±0,14*	1,91±0,09**	5,70±0,13*

Примечание: * - достоверные различия относительно интактной серии ($p<0,001$); ** - ($p<0,05$).

ПРОТЕИНАЗЫ - ТЕСТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЗОНОТЕРАПИИ

Кроме того, выявлено увеличение молекулярных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов и достоверное накопление конечных, наиболее токсичных продуктов ПОЛ – оснований Шиффа (ОШ) в ткани поджелудочной железы в 3,8 раза ($p < 0,05$) (табл. 3).

Таблица 3. Уровень молекулярных продуктов ПОЛ при введении дозы озона 3,033 мкг.

Ткань	ОШ отн ед/мг общих липидов (интактная группа)	ОШ отн ед/мг общих липидов
Пж	14,22±0,96	21,00±1,07*
Киш	12,40±1,02	17,20±1,24*
Пл	10,67±0,88	14,47±1,36*

Примечание: * - достоверные различия относительно интактной серии - ($p < 0,05$).

Дальнейшие исследования выявили дефицит α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в плазме крови, и учитывая высокий уровень ПОЛ в исследуемых тканях (табл. 3), а также литературные сведения о повреждении свободными радикалами, в первую очередь, белковых молекул [23-25], очевидно, что происходит окисление активных центров ингибиторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Рассматривая особенности ответной реакции системы протеолиза и ПОЛ на фоне введения озонированных растворов, очевидно, что эффект зависит от общей дозы озона.

Введение невысоких доз озона, приводит к образованию озонидов, которые выступают в роли "триггеров", запускающих процессы адаптации и индуцирующих биохимические и гемодинамические реакции, лежащие в основе естественных механизмов активации, компенсации и регенерации.

Повышение протеолитической активности в плазме крови при шестикратном введении более высоких доз озона, накопление токсичных продуктов ПОЛ, свидетельствует о нарушении баланса в системах протеолиз – антипротеолиз и ПОЛ-антиоксидантная защита.

В целом, проведенный анализ показал, что определение активности протеолитических ферментов необходимо использовать как высокочувствительный индикатор безопасности применения озонированных растворов и эффективности различных лечебных программ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гомазков О.А. (1996) Усп. совр. биол., **116**, 60-68.
2. Карпищенко А.И., Демидов А.Н., Тырененко В.В. и др. (2000) Клинический лаборатор. диагностика, №3, 10-13.
3. Кирковский В.В. (1997) Детоксикационная терапия при перитоните. Минск.: "Полифакт-Альфа".
4. Мареев В.Ю. (2000) Рус. мед. журнал, **8** (116-117), 602-609.
5. Соловьева Н.И., Елисеева Ю.А., Локина Л.А. (1995) Вестн. РАМН, №2, 3-9.
6. Иванов Е.М., Кытикова О.Ю., Новгородцев А.Д. (2006) Озонотерапия в гериатрии, Изд-во Дальневост. ун-та, Владивосток.

7. Качалина Т.С., Гречканев Г.О. (2007) Озоновые технологии в акушерстве и гинекологии, Изд-во НГМА, Н. Новгород.
8. Конторщикова К.Н., Перетягин С.П. (2006) Закономерность формирования адаптационных механизмов организмов млекопитающих при системном воздействии низкими терапевтическими дозами озона, диплом открытия №309 № А-389.
9. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961) Arch. Biochem. Biophys., **95**, 271-278.
10. Карягина И.Ю., Зарембский Р.А., Балябина М.Д. (1990) Лаб. дело, №2, 10-13.
11. Fletcher D.L., Dillared C.J., Tappel A.Y. (1973) Analyt. Biochem., **52**, 497-499.
12. Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н. (1987) Биоорг. химия, **13**, 748-753.
13. Бобырева Л.Е. (1996) Пробл. эндокринолог., **46**(6), 14-19.
14. Горелышева В.А., Смирнова О.В., Дедов И.И. (1996) Пробл. эндокринолог., **46**(6), 165-167.
15. Nerup J. (1994) Diabetologia, **37**(3), 82-89.
16. Чемитова Л.М. (2006) Структурно-функциональные отношения в рядах пептидных субстратов и ингибиторов эластаз. Дисс.канд.наук, Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск.
17. Azizi M., Boutouyrie P., Bissery A. et al. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 780-787.
18. Carretero O.A. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 588-591.
19. Доценко В.Л., Демидова Т.Ю., Нешкова Е.А. и др. (1999) Вопр. мед. химии, **44**(2), 14-17.
20. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. (2001) Окислительный стресс, МАИК "Наука"/интерпериодика, М.
21. Сергеева Т.В., Кобалава Ж.Д., Чистяков Д.А. (2000) Клин. Мед., **7**, 9-15.
22. Швецов М.Ю. (2000) Тер. архив, **6**, 73-79.
23. Арчаков А.И., Мохосев И.М. (1991) Биохимия, **54**, 179-186.
24. Желебенко Г.И., Васильев И.Т., Яровая Г.А., Муладзе Р.Б. (1995) Вопр. мед. химии, №1, 49-53.
25. Cross C., Reznic A. Z., Packer L. et al. (1992) Free Radical Res. Comms., **15**, 347-352.

Поступила: 26. 06. 2007.

THE PROTEOLYTIC ENZYMES – HIGHLY SENSITIVE CRITERIUM OF EFFECTIVENESS AND SAFETY OF TREATMENT

J.R. Yefremenko

Nizhnyi Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin sq., N. Novgorod, 603005 Russia;
tel.: (8312) 377407; fax: (8312) 390314; e-mail: julia_lisina@mail.ru

The effect of ozonated saline on proteolytic enzymes: trypsin, chymotrypsin, elastase, kallikrein, leucine aminopeptidase, inhibitors of proteolysis and lipid peroxidation has been investigated. Injection of ozonated saline led to significal response of proteolytic system. Ozonated saline with low ozone doses produced a positive effect on proteolytic system. High doses of ozone produced significal reinforcement of proteolytic system and the decrease of α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin activity in blood plasma. Therefore, analyses of proteolytic activity can be used as indicator of effectiveness and safety of ozonotherapy and others treatment programm.

Key words: ozone, trypsin, kallikrein, elastase, pancreas.