

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ ПРИ ВЫЗДОРОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

Щербак В.В., Кубышкин А.В., Алиев Л.Л., Федосов М.И.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского»

Введение. Вопросам патогенеза воспалительных заболеваний легких уделяется большое внимание исследователей [1, 2]. Это связано с широкой распространенностью заболеваний и высоким процентом хронизации с развитием хронического обструктивного заболевания легких [3].

Следует отметить, что основное внимание исследователей направлено на изучение механизмов повреждения легких при формировании воспаления, которые изучены довольно хорошо [4, 5, 6]. В частности, установлено, что особенно важную роль в процессах повреждения легких играет формирование дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе [7, 8], а наследственный дефицит α -1 ингибитора протеиназ приводит к формированию эмфиземы легких [9]. Важное значение протеолитических механизмов в развитии легочной патологии позволяет предположить, что протеолитические ферменты и их ингибиторы могут участвовать в процессах выздоровления, однако их роль в процессах восстановления легких практически не изучена.

Цель исследования – изучить изменения процессов протеолиза в различные сроки восстановления после острого и хронического экспериментального воспаления легких.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проводились на 46 белых крысах-самцах линии «Вистар». Воспалительный процесс в легких моделировали путем введения стерильной капроновой нити диаметром 0,2 мм и длиной 3,5 см в трахею животных. Животные были разделены на следующие группы. Первая, контрольная группа, состояла из 10 здоровых животных. Крысам второй группы ($n=10$) моделировалось воспаление легких, но через 2 недели нить из трахеи вынималась и в течение 2 недель шел процесс выздоровления. Крысам третьей группы ($n=8$) нить из трахеи извлекалась через 2 месяца после моделирования воспаления и в течение 4 недель шел процесс выздоровления. Группой сравнения для оценки процесса выздоровления после острого воспаления была двухнедельная модель воспаления ($n=10$), а группой сравнения для оценки процессов выздоровления после хронического – трехмесячная модель воспаления ($n=8$). Крысы выводились из эксперимента в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследованиях и других научных целях» (Stras-

burg, 1986). Умерщвление животных осуществлялось декапитацией под эфирным наркозом. Кровь для исследований получали из яремной вены. У животных выделяли легочальвеолярный комплекс и получали бронхоальвеолярный смыв путем промывания легких через трахею 10 мл физиологического раствора.

В сыворотке крови и бронхоальвеолярном смыве изучали показатели протеиназ-ингибиторной системы с использованием энзиматических методов [10]. Эластазоподобную активность (ЭПА) определяли по скорости ферментативного гидролиза синтетического субстрата N-т-бок-L-аланил-п-нитрофенилового эфира (БАНФЭ), трипсиноподобную активность (ТПА) по скорости отщепления бензоил-аргинина от N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ), а-1 ингибитор протеиназ (а-1-ИП), антитриптическую активность (АТА) и кислотостабильные ингибиторы (КСИ) по торможению биологическим материалом ферментативного гидролиза трипсином БАЭЭ.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M) и оценкой средней ошибки (m), достоверными считали результаты при $p < 0,05$ с использованием критерия Стьюдента.

Результаты. Как показали проведенные исследования, при развитии острого экспериментального воспаления легких в сыворотке крови происходили изменения, характерные для развития острого воспалительного процесса, проявляющиеся уменьшением уровня протеиназ и увеличением уровня их ингибиторов (табл. 1). Выявлено, что активность трипсиноподобных и эластазоподобных протеиназ уменьшались на 76,9 % и 22,2 % соответственно. Одновременно с этим происходило достоверное увеличение уровня а-1-ИП на 50,5%, а также наблюдалась тенденция к увеличению КСИ. При удалении капроновой нити из трахеи животных процесс выздоровления характеризовался нормализацией трипсиноподобной активности. При этом ЭПА не только возвращалась к контрольным значениям, но и становилась достоверно выше на 25,5 % по сравнению с контролем. Динамика изменения ингибиторов протеиназ проявлялась тенденцией к нормализации уровня а-1-ИП, а уровень КСИ увеличивался и становился достоверно более высоким как по сравнению с острым воспалением, так и по сравнению с контролем.

Таблица 1. Состояние показателей сыворотки крови крыс при развитии острого воспаления и в процессе выздоровления

	Показатели	Контроль	Воспаление 2 нед.	Воспаление 2 нед. Выздоровление 2 нед
	n	10	10	10
ТПА мкМ/мл*мин	M±m	0,23+0,04	0,13+0,01	0,21+0,05
	p ₁		<0,01	>0,05
	p ₂			>0,25
ЭПА, мкМ/мл мин	M±m	2,47+0,09	2,02+0,16	3,10+0,32
	p ₁		<0,01	<0,05
	p ₂			<0,01
а-1-ИП ИЕ/мл	M±m	27,9+4,37	42,0+2,38	36,2+6,35
	p ₁		<0,01	>0,5
	p ₂			>0,5
КСИ ИЕ/мл	M±m	6,84+1,08	7,86+0,301	9,00+0,16
	p ₁		>0,05	<0,05
	p ₂			<0,001

Примечание: p₁ – показатель достоверности по отношению к контролю, p₂ – показатель достоверности по отношению к двухнедельному воспалению

Более выраженные изменения были отмечены в бронхоальвеолярном секрете. Развитие острого экспериментального воспаления проявлялось тенденцией к увеличению эластазоподобных и трипсиноподобных протеиназ, а также кислотостабильных ингибиторов, анти-триптическая активность достоверно уменьшалась более чем в 2 раза (табл. 2). Процесс

выздоровления не приводил к нормализации ЭПА и даже сопровождался ее увеличением на 76,4 % по сравнению с контролем, а уровень ТПА возвращался к показателю контрольной группы. Уровень ингибиторов изменялся с превышением контрольных значений, так АТА возрастала, превышая контроль почти в 2 раза, а КСИ увеличивались в 3 раза.

Таблица 2. Состояние показателей бронхоальвеолярного секрета крыс при развитии острого воспаления и в процессе выздоровления

	Показатели	Контроль	Воспаление 2 нед.	Воспаление 2 нед. Выздоровление 4 нед
	n	10	10	10
ЭПА, нМ/мг мин	M±m	7,65+1,77	10,9+0,70	13,5+3,58
	p ₁		>0,1	<0,01
	p ₂			>0,5
ТПА мкМ/мг*мин	M±m	1,21+0,36	1,94+0,52	1,06+0,2
	p ₁		>0,5	<0,05
	p ₂			>0,5
АТА мИЕ/мг	M±m	25,5+4,1	12,7+2,19	45,2+8,00
	p ₁		<0,001	<0,001
	p ₂			<0,001
КСИ мИЕ/мг	M±m	15,1+6,46	23,0+2,87	45,1+1,47
	p ₁		>0,5	<0,001
	p ₂			<0,001

Примечание: p₁ – показатель достоверности по отношению к контролю, p₂ – показатель достоверности по отношению к двухнедельному воспалению

В результате действия повреждающего фактора в течение трёх месяцев развивалось хроническое воспаление лёгких. При этом изменения в сыворотке крови были менее выражены, чем при остром воспалении и проявлялись формированием дисбаланса между протеазами и их ингибиторами с увеличением ТПА и ЭПА и понижением уровней а-1-ИП и КСИ (табл. 3). Трипсиноподобная активность увеличивалась в 2 раза, а активность а-1-ИП снижалась на 62,2 % по сравнению с контролем. В процессе выздоровления отмечалась тенденция к нормализации уровней ЭПА и

ТПА на фоне увеличения активности ингибиторов. Уровень а-1-ИП увеличивался на 74,4 % по сравнению с хроническим воспалением, становясь близким к контрольному значению, а КСИ увеличивались с превышением контроля на 53,5 %.

При изучении БАС при хроническом экспериментальном воспалении были выявлены более специфические изменения. При трехмесячном воспалении наблюдалось увеличение протеолитической активности эластазоподобных протеиназ в 2,5 раза, а трипсиноподобных протеиназ в 14 раз. Также отмечено увеличе-

ние антитриптической активности в 2,5 раза (табл. 4). Выявленные изменения свидетельствуют о продолжающихся процессах повреждения в легочной ткани. При выздоровлении по сравнению с хроническим воспалением протеолитическая активность снижалась, од-

нако полной нормализации не происходило. ЭПА и ТПА оставались на значительно повышенном уровне, превышая контрольные значения в 2 и в 4 раза соответственно. Увеличенным на 77,6 % по сравнению с контролем оставался и уровень АТА.

Таблица 3. Состояние показателей сыворотки крови крыс при развитии хронического воспаления и в процессе выздоровления

	Показатели	Контроль	Воспаление 3 мес.	Воспаление 2 мес.
				Выздоровление 4 нед
	n	10	8	8
ЭПА мкМ/мл*мин	M±m	2,47±0,09	2,53±1,01	2,09±0,32
	p ₁		>0,5	>0,5
	p ₂			>0,5
ТПА мкМ/мл*мин	M±m	0,23±0,04	0,47±0,02	0,25±0,00
	p ₁		<0,001	>0,5
	p ₂			>0,5
a-1-ИП ИЕ/мл	M±m	27,9±4,37	17,2±0,94	30,0±1,57
	p ₁		<0,01	>0,5
	p ₂			<0,001
КСИ ИЕ/мл	M±m	6,84±1,08	6,09±1,77	10,5±0,66
	p ₁		>0,5	<0,01
	p ₂			<0,01

Примечание: p₁ – показатель достоверности по отношению к контролю, p₂ – показатель достоверности по отношению к трехмесячному воспалению

Таблица 4. Состояние показателей БАС крыс при развитии хронического воспаления и в процессе выздоровления

	Показатели	Контроль	Воспаление 3 мес.	Воспаление 2 мес.
				Выздоровление 4 нед.
	n	10	8	8
ЭПА мкМ/мг*мин	M±m	7,65±1,77	26,1±4,84	16,9±1,08
	p ₁		<0,001	<0,001
	p ₂			<0,05
ТПА мкМ/мг*мин	M±m	1,21±0,36	18,2±1,40	5,02±0,31
	p ₁		<0,001	<0,001
	p ₂			<0,001
АТА мИЕ/мг	M±m	25,5±4,5	63,4±5,32	45,3±6,32
	p ₁		<0,001	<0,01
	p ₂			<0,05
КСИ мИЕ/мг	M±m	15,1±6,46	17,2±5,3	20,0±2,02
	p ₁		>0,5	>0,5
	p ₂			>0,5

Примечание: p₁ – показатель достоверности по отношению к контролю, p₂ – показатель достоверности по отношению к трехмесячному воспалению

Таким образом, в процессе формирования острой и хронической экспериментальной пневмонии можно отметить, что в крови развивается неспецифическая реакция организма. Наиболее существенными закономерностями этой реакции следует признать активацию систем протеолиза в острую стадию воспаления и снижение контроля со стороны ингибиторов в хроническую стадию. В процессе выздоровления в сыворотке крови как после острого, так и после хронического воспаления в основном происходит нормализация показателей. Однако в бронхоальвеолярном секрете при выздоровлении после хронического воспаления сохраняются повышенные значения активности эптазаподобных и трипсиноподобных протеиназ, что может способствовать дальнейшему развитию морфологических по-

вреждений структуры легочной ткани. Полученные результаты позволяют предположить, что при лечении бронхолегочной патологии следует учитывать состояние протеиназ-ингибиторного баланса не только в период развития воспаления, но и на этапе выздоровления.

Выводы: 1. Развитие острого и хронического воспаления легких характеризуется формированием дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе, который более выражен на уровне бронхоальвеолярного секрета и проявляется активацией трипсино- и эптазаподобных протеиназ.

2. Процесс выздоровления после острого и хронического воспаления в легких характеризуется нормализацией показателей системы протеолиза в сыворотке крови при выздоров-

лении после острого воспаления и сохранением повышенной активности эластазоподобных протеиназ при выздоровлении после хронического воспаления.

3. В бронхоальвеолярном секрете в процессе выздоровления после острого воспаления выявляется высокий уровень эластазо-

добных протеиназ и ингибиторов, а после хронического происходит снижение уровня ингибиторов при сохраняющемся высоком уровне эластазоподобных и трипсиноподобных протеиназ, что может способствовать дальнейшему формированию морфологических изменений в легких на этапе выздоровления.

ЛІТЕРАТУРА:

1. **Ghanei M., Harandi A.A.** Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: a review // *Inhal. Toxicol.* – 2011. – V. 23. – P. 363-371.
2. **Yang I.A., Relan V., Wright C.M.** Common pathogenic mechanisms and pathways in the development of COPD and lung cancer // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2011. – V. 15. – P. 439-456.
3. **Cornwell W.D., Kim V., Song C., Rogers T.J.** Pathogenesis of inflammation and repair in advanced COPD // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – V. 31. – P. 257-266.
4. **Higenbottam T., Siddons T., Demoncheaux E.** The direct and indirect action of inhaled agents on the lung and its circulation: lessons for clinical science // *Environ Health Perspect.* – 2001. – V. 109. – P.559-562.
5. **Moraes T.J., Zurawska J.H., Downey G.P.** Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury // *Curr Opin Hematol.* – 2006. – V. 13. – P. 21-27.
6. **Lentsch A.B., Ward P.A.** Regulation of experimental lung inflammation // *Respir. Physiol.* – 2001. – V 128(1). – P. 17-22.
7. **Abboud R.T., Vimalanathan S.** Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2008. – V. 12. – P. 361-367.
8. **Hollander C., Westin U., Wallmark A. et al.** Plasma levels of alpha 1-antichymotrypsin and secretory leukocyte proteinase inhibitor in healthy and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subjects with and without severe alpha 1-antitrypsin deficiency // *BMC Pulm. Med.* – 2007. – V.7. – P.154-159.
9. **Kubyskhin A, Fomochkina I.** Can acquired proteolytic enzyme inhibitors deficiency take part in inflammatory lung pathology? 6th International Congress of Pathophysiology 2010: P-018.
10. **Кубишкін А.В., Харченко В.З., Семенець П.Ф. та ін.** Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах. (Методичні рекомендації) // Київ, 2010.

Щербак В.В., Кубишкін А.В., Алиев Л.Л., Федосов М.И. Изменение показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов при выздоровлении после острой и хронической экспериментальной пневмонии // *Український медичний альманах.* – 2011. – Том 14, № 6. – С. 61-64.

В статье проведен сравнительный анализ изменений показателей системы протеолиза в сыворотке крови и бронхоальвеолярном смыве при выздоровлении после острого и хронического экспериментального воспаления легких. Установлено, что в сыворотке крови в процессе выздоровления после острого воспаления происходит нормализация показателей, а после хронического воспаления в сыворотке сохраняется высокий уровень активности эластазоподобных протеиназ. Изменения в бронхоальвеолярном смыве более специфичны и проявляются при восстановлении легких после острого воспаления сохранением высокой эластазоподобной активности и повышенным уровнем ингибиторов протеиназ, а при выздоровлении после хронического воспаления сохранением высоких уровней эластазоподобной и трипсиноподобной активности.

Ключевые слова: воспаление легких, протеолиз, ингибиторы.

Щербак В.В., Кубишкін А.В., Алиев Л.Л., Федосов М.И. Зміна показників системи неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів при одужанні після гострої і хронічної експериментальної пневмонії // *Український медичний альманах.* – 2011. – Том 14, № 6. – С. 61-64.

У статті проведено порівняльний аналіз змін показників системи протеолізу в сироватці крові і бронхоальвеолярному змиві при одужанні після гострого та хронічного експериментального запалення легень. Встановлено, що в сироватці крові в процесі одужання після гострого запалення відбувається нормалізація показників, а після хронічного запалення в сироватці зберігається високий рівень активності еластазоподобних протеїназ. Зміни в бронхоальвеолярному змиві більш специфічні і проявляються при відновленні легень після гострого запалення збереженням високої еластазоподобної активності і підвищенням рівнем інгібіторів протеїназ, а при одужанні після хронічного запалення збереженням високих рівнів еластазоподобної і трипсиноподобної активності.

Ключові слова: запалення легень, протеоліз, інгібітори.

Scherbak V.V., Kubyskhin A.V., Aliev L.L., Fedosov M.I. Changing of nonspecific proteolytic enzymes and their inhibitors during recovery after acute and chronic experimental pneumonia // *Український медичний альманах.* – 2011. – Том 14, № 6. – С. 61-64.

A comparative analysis of changes in parameters of proteolysis in blood serum and bronchoalveolar lavage fluid during recovery after acute and chronic experimental pneumonia it was studied. It is established that in the healing process after acute inflammation in serum there is a normalization parameters, and after the chronic inflammation presents a high level of activity elastase-like proteases. Changes in bronchoalveolar lavage fluid more specific and occur in the recovery after acute lung inflammation high elastase-like activity and elevated levels of protease inhibitors, and during convalescence after chronic inflammation, maintaining high levels of trypsin-like and elastase-like activity.

Key words: fever of lungs, proteolysis, inhibitors.

Надійшла 14.09.2011 р.
Рецензент: проф. Н.К.Казімірко