

<sup>1</sup>М.Ф. СТАРОДУБ, доктор біологічних наук, професор

<sup>2</sup>Л.М.САМОХІНА, кандидат біологічних наук

<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ,

<sup>2</sup>ДУ „Інститут терапії імені Л.Т.Малої АМН України”, м.Харків

## ДЕЯКІ АСПЕКТИ СПЕЦИФІЧНОГО ТА ВИСОКОЧУТЛИВОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ХІМАЗИ В ПЛАНІ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ФАРМАКОТЕРАПІЇ

*Підібрані оптимальні умови високочутливого визначення активності хімази в біологічних рідинах з використанням ефективного інгібітору конкуруючих протеїназ і проведено аналіз можливостей дослідження її активності у людини і деяких тварин. Показано, що використання для проведення протеолітичної реакції комплексів пероксидази хрому з фрагментом 5-8 ангіотензину II та 4-8 ангіотензину II за умов імобілізації в концентрації 30 мкг/мл і завчасне пригнічення трипсиноподібних ферментів за допомогою дії соєвого інгібітору трипсину в концентрації 0,01 мкг/мл протягом 5 хвилин забезпечує можливість специфічного визначення активності хімази в біологічних рідинах людини і тварин. Використання вказаного методу для оцінки ефективності нових лікарських засобів, особливо призначених для лікування гіпертензії, сприятиме попередженню розвитку пошкоджень органів-мішеней.*

*Ключові слова: хімаза, методи, субстрати, інгібітори, лікарські засоби.*

Серцево-судинні захворювання широко поширені серед дрібних домашніх тварин [1]. За останні два десятиліття ветеринарна наука зробила великий крок вперед у вивченні патогенезу, діагностиці, лікуванні та профілактиці серцево-судинних захворювань. Однак, незважаючи на досягнуті успіхи, залишається ряд захворювань, про які відомо не так вже й багато. Особлива увага приділяється гіпертензії, розвиток якої призводить до пошкодження органів-мішеней. Найбільш чутливими до підвищеного кров'яного тиску органами є головний мозок, очі, нирки і серце. Для безпосереднього зниження кров'яного тиску та профілактики пошкодження органів-мішеней, необхідно спрямувати зусилля на зниження вазоконстрикції (як наслідок, зниження загального периферичного опору судин) і зниження затримки води і натрію (зниження перед- і постнавантаження полегшує роботу серця). Найбільш широко з цією метою використовуються інгібітори ангіотензинперетворюючого фермента (іАПФ). За допомогою АПФ, ключового компонента ренін-ангіотензинової системи (РАС) у легеневій судинній системі ангіотензин I (AI) перетворюється в вазоконстрикторний пептид ангіотензин II (AII) [2].

Використання іАПФ, в свою чергу, може призвести до прояву цілого спектру побічних ефектів, серед яких [гіпотонія](#), сухий [кашель](#), [гіперкаліємія](#), [гостра ниркова недостатність](#), [дизгезія](#), ангіонабряк, [гепатотоксичність](#), зниження [лібідо](#), [синдром Стивенса-Джонсона](#), ризик падіння і переломів. Останній ефект препаратів може бути пов'язаний як зі зміною структури кісток, так і з імовірністю значного зниження тиску при зміні положення тіла. Вказані побічні ефекти,

пов'язані із застосуванням іАПФ, переважно відносять до специфічних [3]. Неспецифічні побічні ефекти іАПФ стосуються порушення смакових відчуттів, лейкопенії (нейропенії), шкірних висипань, диспепсичних розладів, інш. При гострих отруєннях іАПФ провідною ознакою токсичного ураження серця є синоатріальна блокада входу [4].

Окрім того, існують інші ферменти, відмінні від АПФ, що каталізують розщеплення АІ до АІІ, як-от: хімаза, тонін, катепсин G [2].

Хімаза (ЕС.3.4.21.39) опасистих клітин (ОК) відноситься до нейтральних протеїназ і ідентифікована як основний фермент, що утворює АІІ у тканині серця. Вона є результатом інтенсивних пошуків вазоактивного ферменту, стійкого до іАПФ [5, 6]. Її, як АІІ-утворюючий фермент, додатково до АПФ містять судинні тканини не лише людини, але і мавп, собак і хомяків [7, 8, 9]. Слід зазначити, що хімази різних видів тварин відрізняються відносно до генерації і розпаду АІІ [10]. Хімаза кролів, щурів, мишей розщиплює АІІ на неактивні фрагменти.

Слід також зауважити, що оцінка активності хімази є ефективним способом діагностики причин смерті від анафілактичного шоку при передозуванні ліками, порівняно з визначенням загального імуноглобуліна Е в сироватці крові [11].

Для контролю участі хімази в патогенезі захворювання поширена оцінка густини хімазопозитивних ОК імуногістохімічним методом [11, 12]. Активність хімази досліджують флуориметричним методом [10]. Проводяться дослідження хімази з використанням ПЦР-аналізу експресії її мРНК [10, 13, 14].

Для дослідження активності хімази, особливо у дрібних домашніх тварин, необхідні високочутливі технології, які дозволять проводити діагностику не тільки в крові, а і в таких біологічних рідинах, як сеча і навіть слина.

Ефективним у визначенні активності протеїназ у біологічних рідинах є твердофазний метод, заснований на використанні для протеолітичної реакції іммобілізованих на поверхні полістиролу комплексів субстратів білкової природи і маркерного ферменту – пероксидази хрому (ПХ) [15]. У цьому випадку чутливість аналізу становить  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  г. Дія протеїназ призводить до розщеплення субстрату і вивільнення маркерного ферменту. Використання специфічних субстратів і інгібіторів конкуруючих протеїназ забезпечує проведення високочутливого аналізу їх активності у біологічних рідинах.

Оптимальний субстрат для хімази серця людини повинен містити структуру: Хаа-Pro-Phe, Туг або Тгр-Уаа-Уаа, де Хаа – будь-яка амінокислота, Уаа – будь-яка амінокислота, крім Pro [16]. Таким є фрагмент 5-8 АІІ: Пе-His-Pro-Phe. Аналогічну специфічність має і хімаза хом'яків, на відміну від щурів, у яких хімаза здатна розщеплювати зв'язок Туг-Пе АІІ, що є у фрагменті 4-8 АІІ: Туг-Пе-His-Pro-Phe.

Хімаза має хімотрипсинподібну активність [17]. Ефективним інгібітором конкуруючих трипсиноподібних протеїназ є соєвий інгібітор трипсину (СІТ) [18].

Мета роботи – підібрати оптимальні умови високочутливого визначення активності хімази в біологічних рідинах з використанням ефективного інгібітору конкуруючих протеїназ і провести аналіз можливостей дослідження її активності у людини і різних тварин.

**Методи дослідження.** Дослідження проведене з використанням високочутливого ( $10^{-9}$ - $10^{-10}$  г) способу визначення активності протеїназ [15].

У якості субстрату використовували альбумін сироватки бика (БСА), враховуючи, що хімазоподібні ферменти, в тому числі хімаза, спроможні розщеп-

лювати альбумін [19]. Для більш специфічного аналізу активності хімази використовували у якості субстратів фрагменти 4-8 і 5-8 АП. Комплекси маркерного ферменту ПХ і зазначених вище субстратів утворювали за допомогою метаперіодатного окислення. Концентрацію білка в комплексах оцінювали спектрофотометричним методом. Їх іммобілізацію на полістиролових плашках проводили шляхом висушення із розчину 0,5 М гідрокарбонату амонію при 37 °С. Неіммобілізовані молекули відмивали дистильованою водою з 0,05 % твін-20.

Для запобігання можливості розщеплення ПХ перед протеолітичною реакцією здійснювали пригнічення трипсиноподібних протеїназ. Для цього окремо на гітравальній панелі до 0,2 мл досліджуваної рідини добавляли 0,2 мл розчину СІТ у концентрації 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 і 1 мкг/мл і інкубували 5 хв. при 37 °С.

Після проведення протеолітичної реакції 15 хв при 37 °С здійснювали видалення її продуктів відмиванням і оцінку активності хімази за залишковою активністю ПХ відносно її участі в реакції каталізу розщеплення перекису водню та окислення вивільненим киснем ортофенілєндіаміну.

У якості нульового контролю використовували робочій буфер, оптична щільність якого відповідає максимальній активності ПХ. Розраховули активність хімази у відсотках розщеплення субстрату відносно максимальної активності ПХ та з урахуванням молекулярної маси субстрату в Е (мкмоль субстрату за хв.).

При використанні в якості субстрату БСА додатковим контролем слугували розчини трипсину в концентрації 0,005-4 мкг/мл. В такому разі здійснювали розрахунок активності нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП) за каліброваною кривою, яку будували за результатами вимірювань оптичної густини контрольних розчинів трипсину.

Дослідження проведені з використанням сироватки крові людини (16 здорових осіб, середній вік  $34,8 \pm 1,9$  років), без'ядерних фракцій тканин білих інтактних старих шурів ( $n=10$ , 5 – самки, 5 – самці), дорослих ( $8 \pm 2$  міс.) хом'яків-самців ( $n=6$ ) і шурів-самців ( $n=6$ ).

Експерименти виконували згідно до вимог Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації "Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження" (2008) та загальних етичних принципів експериментів на тваринах, схваленими першим Національним конгресом з біоетики (17-20 вересня 2001 р., м.Київ, Україна).

У дослідженнях використовували ПХ, фрагменти 5-8 і 4-8 АП, СІТ фірми "ICN" (США), гідрокарбонат амонію "Biomedical" (Франція), трипсин фірми "Spofa" (Чехія), БСА, твін-20, соляну кислоту, ортофенілєндіамін, сірчану кислоту, пергідроль і інші реагенти (Росія), полістиролові плашки "Linbro" (США) і багатоканальний мікроспектрофотометр фірми "Flow" (Великобританія).

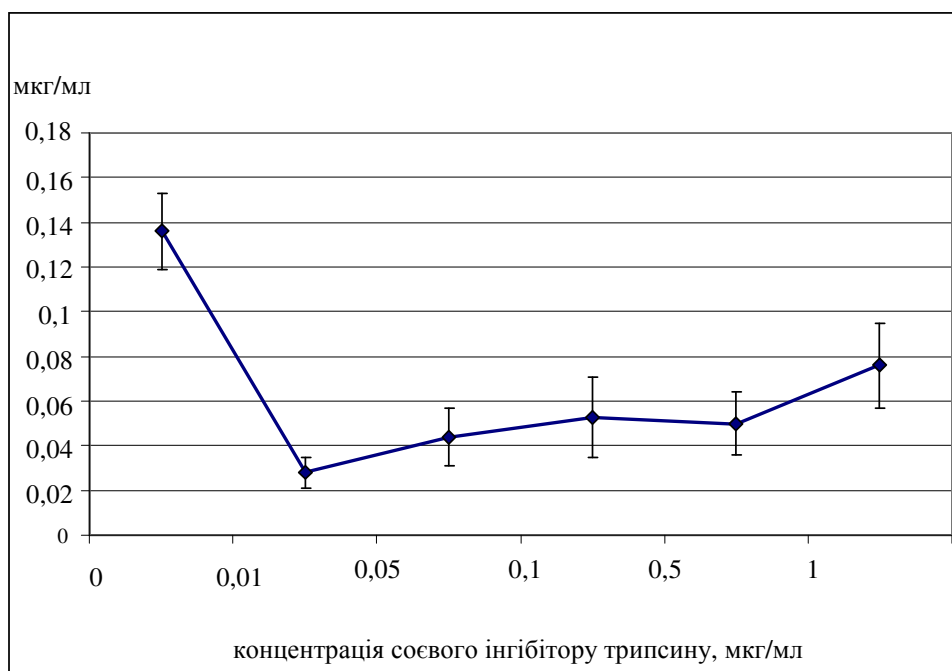
Статистичну обробку отриманих даних проводили за методом Ст'юдента-Фішера з використанням програмного забезпечення Excel.

**Результати та обговорення.** На першому етапі здійснювали підбір оптимальної концентрації фермент-субстратних комплексів для іммобілізації на полістиролових плашках. Попередні дослідження, проведені з використанням БСА, показали, що при іммобілізації ПХ-БСА оптимальною є концентрація 20 мкг/мл [15].

В результаті використання для іммобілізації комплексу ПХ з фрагментом 5-8 АП в концентрації 10, 20, 30 і 40 мкг/мл показано, що оптична щільність суттєво зростає зі збільшенням концентрації комплексу до 30 і 40 мкг/мл (таблиця 1). Таким чином оптимальна концентрація для іммобілізації комплексу ПХ з фрагментом

5-8 АП може становити саме 30-40 мкг/мл. Збільшення оптимуму концентрації при іммобілізації фрагменту 5-8 АП порівняно з тим, що спостерігається з комплексом ПХ-БСА обумовлено меншою молекулярною масою першого субстрату. З метою економії реагентів доцільно використовувати менший допустимий рівень концентрації, яким є 30 мкг/мл. Аналогічні результати отримано при підборі концентрації для іммобілізації комплексу ПХ з фрагментом 4-8 АП (не показано).

Добір оптимальних умов проведення реакції пригнічення трипсиноподібних протеїназ з використанням ПХ-БСА і розчинів трипсину в якості контрольного матеріалу дозволив виявити, що додавання СІТ у концентрації 0,01 мкг/мл приводить до вірогідного зниження рівня протеїназ порівняно з нульовим контролем (рис.). Відзначено відсутність суттєвих розходжень при збільшенні концентрації СІТ. Також встановлено, що при зменшенні концентрації СІТ, менш, ніж 0,01 мкг/мл, знижується достовірність і відтвореність аналізу (не показано).



**Рис. Зміни концентрації трипсину за умов пригнічення активності трипсиноподібних ферментів**

Відомо, що субстратну специфічність хімотрипсину забезпечує Ser189, на відміну від трипсиноподібних протеїназ (трипсин, калікреїн, частково тонін, плазмін), де таким є аспартат (Asp189) [20]. Хімотрипсинподібну специфічність також має простатспецифічний антиген, тромбін секреторних гранул [20, 21]. До дії СІТ чутливий і хімотрипсинподібний катепсин G [22]. З огляду на наведені дані можна вважати, що в результаті пригнічення СІТ активність НТПП буде обумовлена дією рядом ферментів, а саме: хімотрипсин, хімаза, простатспецифічний антиген, тромбін секреторних гранул (за виключенням катепсину G). До того ж, хімотрипсин в плазмі крові людини в нормі відсутній і може надходити до неї з гранулоцитів або ушкоджених тканин лише при активному запальному процесі [23].

**Залежність величини оптичної щільності від концентрації комплексу пероксидази хрому з фрагментом 5-8 ангіотензину II.**

| Концентрація комплексу ПХ з фрагментом 5-8 АП, мкг/мл | $X \pm m_x$ , Од.екст. | $P_{10}$ | $P_{20}$ | $P_{30}$ |
|---|------------------------|----------|----------|----------|
| 10  | 0,090±0,017            |          |          |          |
| 20  | 0,091±0,012            | >0,05    |          |          |
| 30  | 0,804±0,023            | <0,001   | <0,001   |          |
| 40  | 1,258±0,087            | <0,001   | <0,001   | <0,001   |

**Примітка:**  $P_{10}$ ,  $P_{20}$ ,  $P_{30}$  – ступінь вірогідності відмінностей між групами.

Слід зазначити більшу ефективність оцінки активності хімази в біологічних рідинах порівняно з дослідженням густини хімазопозитивних ОК. Це обумовлено тим, що хімазу експресують не лише ОК, а й судинні гладеньком'язові клітини, як це було виявлено у спонтанно гіпертензивних щурів [24].

Гетерогенність і широке поширення хімази вказує на її суттєву роль у різноманітних тканинах [25]. Елементи, необхідні для утворення АП локалізовані в тканинах серця, судин, нирок, легень, наднирників, головного мозку [6, 26]. АП може утворюватися в головному мозку і серці як класичним шляхом, так і за участю неренін-ангіотензинової системи.

Дослідження активності хімази в сироватці крові людини дозволило виявити її рівень  $(1,073 \pm 0,294) E \times 10^{-3}$ . В без'ядерних фракціях тканин старих щурів її рівень був природньо значно менший і мав тканеспецифічний характер (таблиця 2).

Таблиця 2

**Активність хімази ( $E \times 10^{-4}$ ) у старих щурів**

| Досліджені групи | Кора мозку      | Сироватка крові | Легені          | Серце            | Печінка         | Нирки           |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Самки            | 0,303±<br>0,101 | 0,009±<br>0,003 | 0,319±<br>0,110 | 0,416±<br>0,110  | 0,170±<br>0,056 | 0,372±<br>0,075 |
| Самці            | 0,322±<br>0,060 | 0,122±<br>0,031 | 0,207±<br>0,083 | 0,209±<br>0,087' | 1,28±<br>0,42   | 0,14±<br>0,05'  |

До того ж, виявлені статеві відмінності прояву її активності, які можуть мати віддзеркалення на особистостях розвитку патогенезу захворювань внутрішніх органів, що не є темою даного дослідження.

У хом'яків також виявлені прояви тканеспецифічності і зменшений рівень хімази в тканинних зразках порівняно зі щурами (таблиця 3). При цьому цікавим є відомості про відсутність у хом'яків залучення принаймні хімази судин до патогенезу ниркової гіпертензії [27].

Тканеспецифічність прояву активності хімази може бути пов'язана з її функціональними властивостями. Наприклад, хімази гідролізують гепатоцит-ростовий фактор (HGF) – плазміноген-подібний білок з  $\alpha$ -ланцюгом, подібний до  $\beta$ -ланцюга трипсину без пептидазної активності [28]. В результаті відміняється активність фактора, який генерує NK4-подібний антагоніст HGF.

Активність хімази ( $E \times 10^{-4}$ ) у дорослих самців щурів і хом'яків

| Кора мозку             | Гіпоталамус     | Мозочок         | Стовбур мозку   | Сироватка крові | Легені          | Серце           | Печінка         | Нирки           |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Дорослі самці щурів    |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| 0,143±<br>0,053        | 0,209±<br>0,054 | 0,142±<br>0,057 | 0,162±<br>0,052 | 0±0             | 0,208±<br>0,079 | 0,066±<br>0,019 | 0,166±<br>0,039 | 0,105±<br>0,034 |
| Дорослі самці хом'яків |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| 0,036±<br>0,013        | 0,017±<br>0,005 | 0,025±<br>0,009 | 0,014±<br>0,005 | 0,007±<br>0,003 | 0,012±<br>0,003 | 0,019±<br>0,008 | 0,013±<br>0,005 | 0,015±<br>0,006 |

Визначення активності хімази може бути корисним в плані дослідження вікових особливостей її участі в патогенезі захворювань внутрішніх органів для підбору більш ефективної фармакотерапії. Так, у щурів-самців з віком активність хімази зростає в корі мозку, сироватці крові, серці, печінці, що свідчить про її синтез і/або вивільнення, можливість сприяння розвитку вазоконстрикції в серці, корі мозку.

Різноманітний характер можливих впливів змін активності хімази на патогенез внутрішніх органів обумовлює необхідність обґрунтованого призначення і контролю використання лікарських засобів.

Інгібітори хімази можуть бути корисні для попередження пошкодження різних органів за допомогою декількох механізмів, але без зниження кров'яного тиску [29].

Серед препаратів, які впливають на РАС, виділяють і антагоністи рецепторів АII. Побічні ефекти препаратів цієї групи: запаморочення і слабкість, фізикальні симптоми, тобто діарея, судоми або слабкість м'язів, біль у спині чи ногах, безсоння, неритмічне серцебиття, синусити (запалення приносних пазух) і інфекції верхніх дихальних шляхів. Виділяють також сплутану свідомість, важку блювоту, відхилення з боку біохімічного складу крові.

Стабілізатори мембран ОК, наприклад кетотифен, можуть викликати слабкість, сонливість, легке запаморочення, сухість у роті, збільшення маси тіла, тромбоцитопенію [30].

Безліч побічних ефектів відомих фармпрепаратів стимулює науковців до пошуку нових ефективних і безпечних засобів контролю утворення АII в організмі, що потребує впровадження високочутливих технологій дослідження активності хімази в біологічних рідинах. Навіть розробка домен-селективних іАПФ, подвійних іАПФ, таких як непрілізін, який пригнічує активність і ендотелін-перетворюючого фермента, і хімази, є лише стимулом до пошуку нових інгібіторів в продуктах харчування і натуральних продуктах [31].

Таким чином, використання для проведення протеолітичної реакції комплексів ПХ з фрагментом 5-8 АII та 4-9 АII за умов іммобілізації в концентрації 30 мкг/мл і завчасне пригнічення трипсиноподібних ферментів за допомогою дії 0,01 мкг/мл СІТ протягом 5 хвилин забезпечує можливість специфічного визначення активності хімази в біологічних рідинах людини і різних тварин. Перспективним є використання високочутливого визначення активності хімази в біологічних рідинах для оцінки ефективності нових лікарських засобів, призначених для лікування гіпертензії, з метою попередження розвитку пошкоджень органів-мішеней.

### Список використаної літератури:

1. Особенности применения препарата Вазотоп Р при гипертензии кошек // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2010. – №1. – С.49-51.
2. *Fukami H.* Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors / *H.Fukami, H.Okunishi, M.Miyazaki* // *Curr. Pharm. Des.* – 1998. – Vol.4, №6. – P.439-453.
3. *Сидоренко Б. А.* Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента при лечении гипертонической болезни / *Б. А.Сидоренко, М. В.Савченко, Д.В.Преображенский* // *Кардиология.* – 2000. – №2. – С.74-82.
4. *Яцинюк Б. Б.* Опыт терапии острых отравлений ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента / *Б. Б. Яцинюк, В. Г. Сенцов, К. М. Брусин* // *Казанский мед.ж.* – 2011. – №92. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/opyt-terapii-ostryh-otpravleniy-ingibitorami-angiotenzin-prevraschayuschego-fermenta>.
5. Evaluation of endothelium-protective effects of drugs in experimental models of endothelial damage / *V.Kristova, M.Kriska, P.Babal* [et al.] // *Physiol. Res.* – 2000. – Vol.49, №1. – P.123-128.
6. *Liao Y.* The chymase-angiotensin system in humans: biochemistry, molecular biology and potential role in cardiovascular diseases / *Y.Liao, A.Husain* // *Can.J.Cardiol.* – 1995. – Vol.11, Suppl.F. – P.13F-19F.
7. [Chymase inhibition prevents fibronectin and myofibrillar loss and improves cardiomyocyte function and LV torsion angle in dogs with isolated mitral regurgitation](#) / *B.Pat, Y.Chen, C.Killingsworth* [et al.] // [Circulation.](#) – 2010. – Vol.122, №15. – P.1488-1495.
8. [Chymase inhibitor ameliorates hepatic steatosis and fibrosis on established non-alcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet](#) / *S.Masubuchi, S.Takai, D.Jin* [et al.] // [Hepato. Res.](#) – 2012. doi: 10.1111/hepr.12042.
9. [Extended cleavage specificity of the mast cell chymase from the crab-eating macaque \(Macaca fascicularis\): an interesting animal model for the analysis of the function of the human mast cell chymase](#) / *M.Thorpe, J.Yu, V.Boinapally*, [et al.] // [Int Immunol.](#) – 2012. – Vol.24, №12. – P.771-782. doi: 10.1093/intimm/dxs081.
10. Chymase as a proangiogenic factor a possible involvement of chymase-angionetsin-dependent pathway in the hamster sponge angiogenesis model / *M.Muramatsu, J.Katada, I.Hayashi, M.Majima* // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 13-275, Issue 8. – P.5545-5552.
11. [Application of serum total IgE, tryptase and chymase in the identification of death caused by drug anaphylactic shock](#) / *H.J.Wang, W.P.Song, Y.Yang* [et al.] // [Fa Yi Xue Za Zhi.](#) – 2012. – Vol.28, №3. – P.167-171.
12. [Mast cells and eosinophils are involved in activation of ulcerative colitis](#) / *O.Stasikowska-Kanicka, M.Danilewicz, A.Głowacka, M.Wągrowaska-Danilewicz* // [Adv. Med. Sci.](#) – 2012. – P.1-7.
13. [Effects of Panax notoginseng flower extract on the TGF- \$\alpha\$ /Smad signal transduction pathway in heart remodeling of human chymase transgenic mice](#) / *Y.Wang, P.Qian, P.Liu*, [et al.] // [Mol. Med. Report.](#) – 2012. – Vol.5, №6. – P.1443-1448. doi: 10.3892/mmr.2012.856.
14. [Qiliqiangxin improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats through the inhibition of cardiac chymase](#) / *W.Liu, J.Chen, T.Xu*, [et al.] // [Am. J. Hypertens.](#) – 2012. – Vol.25, №2. – P.250-260. doi: 10.1038/ajh.2011.219.
15. Пат. 20171 Україна, МПК С 12 Q 1/38. Спосіб визначення активності протеїназ або їх інгібіторів в біологічних рідинах / Самохіна Л.М., Дубінін А.А.;

заявник і патентовласник Харків, Інститут терапії АМН України. – №4654144/SU; заяв. 22.12.97; опубл. 25.12.97, Бюл. № 6.- 6 с.

16. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart / A.Kinoshita, H.Urata, F.M.Bumpus, A.Husain // *J.Biol.Chem.* – 1991. – Vol.266, № 29. – P.19192-19197.

17. [Discriminating between the activities of human cathepsin G and chymase using fluorogenic substrates](#) / B.Korkmaz, G.Jgot, L.C.Lau [et al.] // *FEBS J.* – 2011. – Vol.278, №15. – P.2635-2646. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08189.x.

18. Влияние трипсина и ингибитора трипсина соевых бобов на свертывание крови, ибринолиз, агрегацию тромбоцитов и гемолитическую активность комплемента in vitro / И.Э.Памирский, М.А.Штарберг, И.Г.Белоглазова, Е.А.Бороздин // *Дальневосточный медицинский журнал.* – 2008. – № 1. – С.98-100.

19. Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand / H.Mitsui, T.Furitsu, A.M.Dvorak [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – Vol.90, №2. – P.735-739.

20. *Villoutreix B.O.* A structural model for the prostate disease marker, human prostate-specific antigen / B.O.Villoutreix, E.D.Getzoff, J.H.Griffin // *Protein.Sci.* – 1994. – Vol.3, №3. – P.2033-2044.

21. *Pejler G.* Identification of the proteolytic thrombin fragments formed after cleavage with rat mast cell protease / G.Pejler, A.R.Karlstrom, L.Berg // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – Vol.227, №1-2. – P.102-107.

22. [Role of neutrophils in mediating human epithelial cell detachment from native basement membrane](#) / T.J.Venaille, A.H.Mendis, M.J.Phillips [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1995. – Vol.95, №2. – P.597-606.

23. Биохимические и клинические аспекты участия гранулоцитов и их протеиназ в поражении стенки сосудов / О.Г.Оглоблина, Л.А.Белова, И.А.Архакова [и др.] // *Тер.архив.* – 1996. – № 5. – С.78-80.

24. Role of chymase-dependent angiotensin II formation in regulating blood pressure in spontaneously hypertensive rats / K.Kirimura, S.Takai, D.Jin [et al.] // *Hypertens Res.* – 2005. – Vol.28, №5. – P.457-464.

25. *Urata H.* Widespread tissue distribution of human chymase / H.Urata, F.Strobel, D.Ganten // *J.Hypertens.Suppl.* – 1994. – Vol.12, №9. – P.S17-S22.

26. Hollenberg N.K. Implications of species difference for clinical investigation: studies on the renin-angiotensin system / N.K.Hollenberg // *Hypertension.* – 2000. – Vol.35, №1, Pt2. – P.150-154.

27. Roles of vascular angiotensin converting enzyme and chymase in two-kinday, one clip hypertensive hamsters / D.Jin, S.Takai, N.Shiota, M.Miyazaki // *J. Hypertens.* – 1998. – Vol.16, №5. – P.657-664.

28. *Raymond W.W.* Mast cell and neutrophil peptidases attack an inactivation segment in hepatocyte growth factor to generate NK4-like antagonists / W.W.Raymond, A.C.Cruz, G.H.Caughey // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol.281, №3. – P.1489-1494.

29. [Takai S.](#) Multiple mechanisms for the action of chymase inhibitors / S.Takai, D.Jin, M.Miyazaki // *J Pharmacol Sci.* – 2012. – Vol.118, №3. – P.311-316.

30. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов дыхания: Рук. для практикующих врачей / А.Г.Чучалин, С.Н.Авдеев, В.В.Архипов [и др.]; Под общей ред. А.Г.Чучалина. – М.: Литтерра, 2004. – 874 с. – (Рациональная фармакотерапия: Сер. рук. для практикующих врачей; Т.5).



31. [Structure based drug design of angiotensin-I converting enzyme inhibitors / C.S.Anthony, G.Masuyer, E.D.Sturrock, K.R.Acharya // Curr. Med. Chem. – 2012. – Vol.19, №6. – P.845-855.](#)

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СПЕЦИФИЧЕСКОГО И ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ХИМАЗЫ В ПЛАНЕ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАКОТЕРАПИИ/ М. Ф.Стародуб, Л. М. Самохина**

Подобраны оптимальные условия высокочувствительного определения активности химазы в биологических жидкостях с использованием эффективного ингибитора конкурирующих протеиназ и проведен анализ возможностей исследования его активности у человека и некоторых животных. Показано, что использование для проведения протеолитической реакции комплексов пероксидазы хрена с фрагментом 5-8 ангиотензина II и 4-8 ангиотензина II в условиях иммобилизации в концентрации 30 мкг / мл и заблаговременное подавление трипсиноподобных ферментов посредством действия соевого ингибитора трипсина в концентрации 0,01 мкг / мл в течение 5 минут обеспечивает возможность специфического определения активности химазы в биологических жидкостях человека и животных.

Исследование активности химазы в сыворотке крови человека позволило выявить ее уровень  $(1,073 \pm 0,294) E \times 10^{-3}$ . В безъядерных фракциях тканей старых крыс ее уровень был естественно значительно меньше и имел тканеспецифичный характер. У хомяков также обнаружены проявления тканеспецифичности и меньший уровень химазы в тканевых образцах по сравнению с крысами.

Показано, что определение активности химазы может быть полезным в плане исследования возрастных особенностей ее участия в патогенезе заболеваний внутренних органов. Разнообразный характер возможных изменений активности химазы при патологии обуславливает необходимость обоснованного назначения и контроля использования лекарственных средств.

Множество побочных эффектов известных фармпрепаратов стимулирует ученых к поиску новых эффективных и безопасных средств контроля образования ангиотензина II в организме. При этом использование указанного метода определения активности химазы для оценки эффективности новых лекарственных средств, особенно предназначенных для лечения гипертензии, будет способствовать предупреждению развития повреждений органов-мишеней.

*Ключевые слова:* химаза, методы, субстраты, ингибиторы, лекарственные средства.

**SOME ASPECTS OF A SPECIFIC AND HIGH-SENSITIVE DETECTIONS OF CHYMASE ACTIVITY IN THE ASSESSMENT OF PHARMACOTHERAPY EFFICIENTLY / <sup>1</sup>M. F.Starodub ., L. M.Samokhina**

*The optimal conditions for highly sensitive determination of chymase activity in biological fluids using an effective competitive inhibitor of proteinases were selected*

*and analysis of research capabilities of its activity in humans and some animals were held. It is shown that the use for the proteolytic reactions of complex of horseradish peroxidase with a fragment of angiotensin II 5-8 and of angiotensin II 4-8 at the its immobilization in a concentration of 30  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , and early inhibition of trypsin-like enzymes by the action of soybean trypsin inhibitor at a concentration of 0.01  $\mu\text{g} / \text{ml}$  for 5 minutes allows specific determination of chymase activity in biological fluids of humans and animals.*

*Investigation of chymase activity in human serum revealed its level ( $1,073 \pm 0,294$ )  $E \times 10^{-3}$ . In the non-nuclear fractions of tissues of old rats it level was naturally much smaller and had a tissue-specific character. The manifestation of tissue specificity and less chymase activities in tissue samples as compared with rats found in hamsters.*

*It is shown that the determination of chymase activity may be useful in the study of age-specific features of its involvement in the pathogenesis of diseases of the internal organs. The diverse character of the possible changes of chymase activity in the pathology is causes the necessitates of informed destination and control of the use of drugs.*

*Many side effects of known pharmaceuticals is encourages scientists to search for new safe and effective means of control of angiotensin II in the organism. The use of this method of determining the activity of chymase to evaluate the effectiveness of new drugs, particularly for the treatment of hypertension, will contribute to the prevention of harm to the target organs.*

*Key words: chymase, methods, substrates, inhibitors and drugs.*

**Рецензент – кандидат ветеринарных наук А. Ф. Ображей**