УДК 616–74/078+616.24–002+616–085:577.152.34

А. В. Кубишкін, І. І. Фомочкіна

Вплив інгібіторів протеїназ на ефективність пригнічення активації протеолізу при запаленні легенів

Определено влияние способа введения ингибиторов протеиназ на эффективность подавления активации протеолиза при воспалении легких. Сравнительное изучение эффективности ингибирования протеиназ при моделировании воспаления легких показало более выраженный эффект при регионарном введении препаратов. Внутривенное и внутрибрюшинное введение ингибиторов в значительно меньшей мере оказывало ингибирующее влияние на местную и системную активацию протеиназ, не снижало острофазный ответ α-1-ингибитора протеиназ, по сравнению с эндобронхиальным введением контрикала и ингипрола. Установлено, что наиболее эффективным в отношении коррекции протеиназингибиторного баланса является эндобронхиальное введение, способствующее значительному увеличению активности ингибиторов протеиназ и подавлению эластолитической активности, снижению клеточной инфильтрации, уменьшению концентрации белка в бронхоальвеолярном смыве, что связано с адресной доставкой препаратов к органу-мишени и созданием максимальной концентрации препаратов в очаге поражения.

ВСТУП

Застосування інгібіторів протеїназ при лікуванні захворювань легенів, з одного боку, обгрунтовано важливою роллю протеїназ у патогенезі бронхолегеневої патології, але з іншого – не знаходить широкого практичного застосування у зв'язку з відсутністю єдиних підходів до їх використання [8, 9, 15]. У зв'язку з цим продовжуються пошуки оптимальних варіантів використання інгібіторів протеїназ, сконцентровані на таких основних напрямах: розробці вузьконаправлених синтетичних інгібіторів протеїназ, пошуку та виділенні нових природних інгібіторів, модифікації схем і методів застосування інгібіторів протеїназ [11, 13, 16, 17].

Згідно з літературними даними, недостатня ефективність антиферментної терапії може бути пов'язана насамперед з малими концентраціями препаратів безпосередньо у вогнищі запалення при їх внутрішньовенному введенні [6, 10, 14]. Найбільш актуальним напрямом вдосконалення методик використання інгібіторів протеїназ є розробка підходів з адресною доставкою та створенням максимальної концентрації препарату в органі-мішені.

Для забезпечення максимальної концентрації в осередку ураження можна використовувати регіонарне введення інгібіторів протеїназ різними способами: внутрішньоартеріальним, аерозольним, внутрішньотрахеальним, внутрішньобронхіальним, внутрішньоплевральним тощо.

Метою нашого дослідження стало вивчення ефективності пригнічення активації протеолізу при запальних захворюваннях легенів залежно від способу введення інгібіторів протеїназ.

МЕТОДИКА

Дослідження виконані на 63 білих лабораторних щурах лінії Вістар масою 150–200 г.

© А. В. Кубишкін, І. І. Фомочкіна

Запальний процес у легенях моделювали за методикою Захарьєвської і Анічкова [1]. Розвиток патології контролювали морфологічними дослідженнями тканини легенів щурів за допомогою фарбування гістологічних зрізів гематоксилін-еозином. Морфологічний контроль підтвердив характерну динаміку розвитку запального процесу в обох легенях. Після ініціації запалення в легеневій паренхімі спостерігалося повнокров'я судин, набряк міжальвеолярних перегородок, накопичення макрофагів і нейтрофілів у просвіті альвеол.

Для оцінки ефективності різних методів введення препаратів використовували комерційний препарат контрикал (Німеччина) та інгібітор з відходів виробництва інсуліну інгіпрол, розроблений у НДІ технології кровозамінників і гормональних препаратів (Москва) [3]. Еквівалентні дози контрикалу 1000 АТрО/100 г та інгіпролу 0,5 мг/100 г вводили, розводячи в 0,2 мл фізіологічного розчину, одночасно з моделюванням запалення ендотрахеально, внутрішньоочеревинно і внутрішньовенно (в яремну вену).

Матеріал для дослідження брали через 1 добу від початку експерименту. Досліди проводили відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986).

Щурів забивали під тіопенталовим наркозом за допомогою кровопускання з сонної артерії, розкривали грудну клітку та виділяли легенево-серцевий комплекс 6–8-кратним промиванням легенів через трахею 10 мл фізіологічного розчину. Отримували 7–8 мл бронхоальвеолярного змиву (БАЗ), який далі центрифугували при 1500 g протягом 15 хв і відбирали супернатант. Для проведення біохімічних досліджень використовували сироватку крові та супернатант БАЗ.

Трипсиноподібну активність сироватки крові і БАЗ вимірювали методом спектрофотометрії, основаному на вимірюванні швидкості відщеплювання N-бензоїл-L-аргініну від синтетичного субстрату N-бензоїл-L-аргініну етилового ефіру ("Reanal", Угорщина) [2]. Вимірювання еластазоподібної активності сироватки крові і БАЗ проводили за гідролізом синтетичного субстрату N-т-бок-аланіл-п-нітрофенілового ефіру ("Reanal", Угорщина) [5]. Розрахунок активності проводили за приростом оптичної густини в пробі за 1 хв і виражали в наномолях гідролізованого субстрату за 1 хв у перерахунку на 1 мл біологічного матеріалу.

Вміст α-1-інгібітора протеїназ (α-1-ІП) і α-2-макроглобуліну (α-2-МГ) визначали уніфікованим методом Нартікової та Пасхіної [4]. Дослідження антитриптичної активності БАЗ проводили на основі принципового підходу, описаного для сироватки крові; в пробу брали 0,25–1,0 мл біологічного матеріалу. Для визначення термокислотостабільного інгібітора в сироватці крові та кислотостабільних інгібіторів в БАЗ, проби заздалегідь обробляли для осадження кислотолабільних білків. Для цього 0,1 мл сироватки крові, розведеної в 10 разів, змішували з 0,1 мл 0,05 М Na-ацетатного буфера (pH 4,1) і прогрівали на водяній бані при 60 °С протягом 20 хв. Після охолодження пробу нейтралізували 0,5 Н розчином NaOH і об'єм доводили 0,05 М тріс-HC1 буфером (pH 8,0) до 1,9 мл [5]. Різницю між приростом оптичної густини експериментальної та контрольної проб використовували для обчислення активності інігібітора, яку виражали в ІО/мл. За 1 ІО приймали таку активність інгібітора, при якій відбувалося пригнічення активності трипсину, що розщеплює 1,0 мкмоль N-бензоїл-L-аргініну етилового ефіру як субстрат за хвилину при 25 °С і pH 8,0.

Вміст білка визначали методом Лоурі [12].

Статистичну обробку отриманих результатів проведено з використанням методів варіаційної статистики з обчисленням

середніх значень (M) і оцінкою вірогідності розбіжностей (m), а також з використанням непараметричних критеріїв (критерій знаків і парний критерій Вілкоксона). Достовірними вважали показники при $P<0,05$ [7]. Статистичні розрахунки виконували в середовищі електронних таблиць Exel для Microsoft Office.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нашими попередніми дослідженнями було встановлено, що в першу добу після ініціації запалення спостерігалося підвищення трипсиноподібної активності сироватки крові з 171±18,5 до 240 нмоль/мл·хв ± 5,5 нмоль/мл·хв, що на 40,4 % більше від контрольних значень. Одночасно з підвищенням трипсиноподібної активності спостерігалися характерні зміни інгібіторів протеїназ, які проявлялися підвищенням активності α-1-ІП на 39 % ($P<0,05$) та майже двократним зниженням α-2-МГ ($P<0,05$). Зміни вмісту інгібіторів у сироватці крові були типовими для розвитку запальної реакції з характерним гострофазовим зростанням α-1-ІП, зниженням „негативного" білка гострої фази α-2-МГ та відсутністю гострофазових змін у кислотостабільних інгібіторах.

У БАЗ спостерігалися більш виражені та специфічні зміни в першу добу розвитку запалення, які проявлялися, насамперед стійкою, достовірною та специфічною активацією еластолітичної активності. Активність еластазоподібних ферментів у контрольній групі становила 1,6 нмоль/мл·хв ± 0,8 нмоль/мл·хв. Через 24 год після ініціації запалення спостерігалося достовірне збільшення цього показника в 12 разів у порівнянні з контролем, питома активність еластази при цьому сягала 19,8 нмоль/мл·хв ± 3,5 нмоль/мл·хв ($P <0,001$).

Трипсиноподібна активність також підвищувалася в першу добу розвитку запалення, але не настільки виражено. У БАЗ тварин контрольної групи вона становила 1,2 нмоль/мл·хв ± 0,4 нмоль/мл·хв, а через 24 год після моделювання запалення перевищувала контрольні значення в 3,5 раза (4,3 нмоль/мл·хв ± 0,4 нмоль/мл·хв).

Підвищення протеолітичної активності супроводжується підвищенням активності інгібіторів протеїназ. Антитриптична активність у БАЗ зростала більше ніж у 10 разів ($P<0,001$), в той час як активність кислотостабільних інгібіторів – менше ніж удвічі. Зважаючи на 5-кратне ($P<0,001$) збільшення вмісту білка в змиві, можна припустити, що при ініціації запалення інгібіторний потенціал підвищується внаслідок збільшення проникності судин у вогнищі запалення.

Виражені та стійкі зміни в протеїназ-інгібіторній системі за першу добу розвитку запального процесу дали змогу використовувати ці терміни для вивчення протекторної дії інгібіторів протеїназ.

Проведені дослідження показали, що ендотрахеальне введення препаратів порівняно з внутрішньовенним інтенсивніше впливало на інгібування активації протеолізу. У сироватці крові внутрішньоочеревинне та внутрішньовенне введення інгібіторів не зменшувало активацію трипсиноподібної активності і не знижувало гострофазову відповідь α-1-ІП, як це спостерігалося при ендотрахеальному введенні (табл. 1). Вміст термокислотостабільного інгібітора суттєво не змінювалася, а α-2-МГ хоч і був достовірно вищим, ніж у групі без застосування інгібіторів, але залишався достовірно нижчим щодо значень у здорових тварин.

У БАЗ залежність ефекту інгібіторів від способу введення виявлялася ще краще (табл. 2). Внутрішньовенне введення контрикалу й інгіпролу ніяк не впливало на накопичення у змиві білка і клітинних компонентів. У цих групах практично був відсутній ефект пригнічення активності протеїназ, яка залишалася фактично на рівні

Таблиця 1. Вплив способу введення інгібіторів протеїназ на зміни в сироватці крові щурів при ініціації запалення легенів (M ± m)

Схема досліду	Трипсиноподібна активність, нмоль/мл·хв	α-1-інгібітор протеїназ, ІО/мл	α-2-макроглобулін, ІО/мл	Термокислотостабільний інгібітор, ІО/мл
Контроль (n = 12)	171,0±18,5	26,7±1,5	3,7±0,2	8,1±0,5
Запалення легенів (n = 12)	240,0±5,5*	37,1±2,5*	1,9±0,1*	8,3±0,3
Запалення і введення контрикалу (n = 6)				
ендотрахеально	188,4±20,5**	28,5±2,5**	2,2±0,3	8,9±0,5
внутрішньоочеревинно	254,4±43,3*	37,7±2,7*	2,6±0,1*,**	9,9±0,5*,**
внутрішньовенно	217,6±47,9	39,6±4,7*	3,1±0,1*,**	9,0±0,8
Запалення і введення інгіпролу (n = 6)				
ендотрахеально	228,9±35,6	32,7±1,1*	1,9±0,1*	9,7±0,5*,**
внутрішньовенно	265,5±30,8*	39,3±2,3*	1,7±0,1*	8,4±0,4

Примітка. Тут і в табл. 2 * P<0,05 відносно контролю, ** P<0,05 відносно групи тварин з запаленням.

значень групи без використання інгібіторів. Слід зазначити, що стан антитриптичної активності та кислотостабільних інгібіторів відрізнявся від аналогічної динаміки показників у групах з ендотрахеальним введенням інгібіторів. Таким чином, внутрішньовенна ін'єкція інгібіторів практично не впливала на активацію протеолізу при ініціації запалення в легенях.

Внутрішньоочеревинне введення контрикалу було більш ефективним, ніж внутрішньовенне. Відбувалося більш ніж двократне зниження вмісту білка, значне зменшення насиченості змиву клітинними компонентами. Не так значно, але достовірно нижче ставала активність трипсино- і еластазоподібних протеїназ, а зміни антипротеїназного потенціалу близькі до аналогічних при ендотрахеальному введенні.

Щодо корекції протеїназінгібіторного балансу результативнішим виявилося ендотрахеальне введення (див. табл. 1, 2). Слід відмітити значне підвищення активності інгібіторів протеїназ і зниження еластолітичної активності, клітинна інфільтрація, концентрація білка в БАЗ, що зумовлено насамперед найбільш суттєвим накопиченням препаратів у вогнищі запалення як при введенні контрикалу, так і інгіпролу.

Ефективність дії інгібіторів пов'язана з їх фармакокінетикою. Період напіввиведення з кровообігу, наприклад, контрикалу становить 30–60 хв, що не дає можливості створити достатню їх концентрацію в крові й у вогнищі запалення. З цим, очевидно, пов'язана недостатня результативність застосування навіть дуже високих доз інгібіторів при внутрішньовенній ін'єкції. Введення інгібіторів ендотрахеально створює їх локальне накопичення в легенях, попадання в бронхи з можливістю безпосередньої дії на вогнище запалення та збереження протягом тривалого часу, що може бути вирішальним чинником реалізації ефектів. При внутрішньоочеревинному введенні можливе створення депо інгібітора з поступовим надходженням у кров і вогнище запалення, і це сприяє більш ефективній дії препарату.

Слід зазначити, що як у крові, так і в БАЗ спостерігається односпрямована тенденція змін в протеїназінгібіторній системі при використанні як контрикалу, так і інгіпролу. Однак ці зміни у використаних дозах препаратів більш суттєво виражені при використанні контрикалу.

Таким чином, ендотрахеальне введення

Таблиця 2. Вплив способу введення інгібіторів протеїназ на протеїназінгібіторний баланс бронхоальвеолярного змиву щурів при ініціації запалення легенів (M ± m)

Схема досліду	Білок,г/л	Клітини, $x10^5$/мл	Трипсиноподібна активність, нмоль/мл·хв	Еластазоподібна активність, нмоль/мл·хв	Антитриптична активність, мІО/мл	Кислотостабільні інгібітори, мІО/мл
Контроль (n = 12)	180±17	4,1±0,4	1,2±0,4	1,6±0,8	15,3±3,2	3,7±1,7
Запалення легенів (n = 12)	939±135*	17,9±3,1*	4,3±0,4*	19,8±3,5*	241,2±24,1*	6,0±2,2
Запалення і введення контрикалу (n = 6)						
ендотрахеально	481±139	9,5±1,9*,**	1,1±0,6**	8,6±1,8*,**	113,5±40,2*,**	17,5±8,9
внутрішньоочеревинно	431±53*,**	10,2±4,5	2,5±0,2*,**	12,1±0,8*,**	175,8±27,4*	23,5±3,5*,**
внутрішньовенно	737±138*	16,9±4,3*	2,3±0,5**	17,1±3,3*	235,4±32,1*	12,7±5,0
Запалення і введення інгіпролу (n = 6)						
ендотрахеально	752±140*	9,2±1,1*	2,7±0,2*,**	13,6±2,3*	291,7±31,5*	24,1±4,3*,**
енутрішньовенно	1051±182*	10,3±1,5*	4,8±1,5*	20,3±0,7*	306,4±50,2*	4,9±3,0

обох інгібіторів протеїназ показало найбільшу ефективність пригнічення активації протеолізу та відновлення протеїназінгібіторної рівноваги, що пов'язане з адресною доставкою препаратів – ендотрахеальним введенням при запаленні легенів – до органа-мішені, що сприяє створенню максимальної концентрації препаратів в осередку ураження.

A. V. Kubyshkin, I. I. Fomochkina

THE INFLUENCE OF INTRODUCTION OF PROTEINASE INHIBITORS ON EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF PROTEOLYTIC ACTIVATION OF PNEUMONIA

We studied the influence of a way of introduction proteinase inhibitors on efficiency of suppression of proteolysis activation during pneumonia. Comparative study of efficiency of proteases inhibition in experimental pneumonia has shown higher efficacy of local introduction of drugs. Intravenous and intraperitoneal introduction of proteinase inhibitors exhibited inhibitory effect of a smaller degree on local and systemic proteases activation, did not decrease an acute phase of response of α-1-protease inhibitor in comparison with endotracheal instillation of Contrycal and Ingiprol. The study has established that endotracheal introduction of proteinase inhibitors is the most effective for correction of the proteinase-inhibitor balance. It also helps to promote the activity proteinase-inhibitor, suppresses elastolytic activity, decreases cellular infiltration, reduces the concentration of proteins in bronco-alveolar lavage fluid that is connected with address delivery of drugs to the target organ creating a maximal concentration of drugs in affected area.

The Crimea State Medical University , Simferopol, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Захарьевская М.А., Аничков Н.Н. Об изменении легочной ткани при введении инородного тела в бронх // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1952. – № 6. – С. 62–67.
2. Кринская А.В., Пасхина Т.С. Количественное определение калликреина и калликреиногена в сыворотке (плазме) крови человека // Совр. методы биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 163–170.
3. Кубышкин А.В., Донецкий И.А., Балабушевич Н.Г., Макаревич И.А. Сравнительное изучение нового панкреатического ингибитора протеиназ при инициации воспаления в легких // Хим.-фарм. журн. – 1993. – № 3. – С. 17–19.
4. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности α_1-антитрипсина и α_2-макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека // Вопр. мед. химии. – 1979. – № 4. – С. 494–499.
5. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Мясникова Л.В. и др. Активность протеиназ гранулоцитов и уровень кислотостабильных ингибиторов протеназ в бронхоальвеолярном секрете детей с бронхопатиями различной этиологии // Там же. – 1980. – № 3. – С. 387–392.
6. Семенкова Г.Г., Сильвестров В.П., Провоторов В.М. Немедленные и отдаленные результаты лечения пациентов с неспецифическимим заболеваниями легких посредством местного примененеия контрикала и антибиотиков // Терап. архив. – 1992. – **64**, № 3. – С. 66–71.

7. Тинни Д. Введение в теорию планирования экспериментов. – М.: Наука, 1970. – С. 33.
8. Шульпекова Ю.О. Апротинин – важный компонент терапии критических состояний // Рус. мед. журн. – 2000. – **8**, № 7. – С. 296–299.
9. Douvas S., Kolokotronis A., Stefanopoulos P. Anti-Inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor // Inf. and Immunol. – 2005. – **73**, № 3. – P. 1271–1274.
10. Griese M., Latzin P., Kappler M. et al. Alpha1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients // Eur. Respir. J. – 2007. – **29**, № 2. – P. 240–250.
11. Hook V. Y., Hwang S.R. Novel secretory vesicle serpins, endopin 1 and endopin 2: endogenous protease inhibitors with distinct target protease specificities // Biol. Chem. – 2002. – **383**, № 7–8. – P. 1067–1074.
12. Lowry O., Rosenbrough U., Farr A., Roundal R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
13. Okumura Y., Ogawa K., Uchiya K. Characterization and primary structure of elastase inhibitor, AFLEI, from Aspergillus flavus // Nippon. Ishinkin. Gakkai. Zasshi. – 2007. – **48**, № 1. – P. 13–18.
14. Ovcharenko A.V., Zhirnov O.P. Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice // Antiviral. Res. – 1994. – **23**, № 2. – P. 107–118.
15. Vender R.L. Therapeutic potential of neutrophil-elastase inhibition in pulmonary disease // J. Invest. Med. – 1996. – **44**. – P. 531–539.
16. Wei S., Chen Y., Chung L. et al. Protein engineering of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) inhibitory domain. In search of selective matrix metalloproteinase inhibitors // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, № 11. – P. 9831–9834.
17. Zheng C.J., Han L.Y., Yap C.W. et al. Therapeutic targets: progress of their exploration and investigation of their characteristics // Pharmacol. Rev. – 2006. – **58**, № 2. – P. 259–279.

Крим. мед. ун-т ім. С.І. Георгієвського, Сімферополь
e-mail: scipro@csmu.strace.net

Матеріал надійшов до редакції 05.05.2008