

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

© В.В. Щербак, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин, 2012.

## ИЗМЕНЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ ПРИ КОРРЕКЦИИ ТЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГКИХ АНТИБИОТИКАМИ, ИНГИБИТОРАМИ ПРОТЕИНАЗ И АНТИОКСИДАНТАМИ

**В.В. Щербак, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин***ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», кафедра патологической физиологии (зав. – профессор А.В. Кубышкин), г. Симферополь.*

### CHANGES OF NON-SPECIFIC PROTEINASES AND THEIR INHIBITORS OF THE EXPERIMENTAL PNEUMONIA IN THE CORRECTION WITH ANTIBIOTICS, PROTEASE INHIBITORS AND ANTIOXIDANTS.

**V. V. Scherbak, I.I. Fomochkina, A.V. Kubyshkin****SUMMARY**

A comparative analysis of changes in parameters of proteolysis in blood serum and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in experimental pneumonia on a background correction by antibiotic, protease inhibitor and antioxidant it was studied. Decreased activity of elastase- and trypsin-like proteases in BAL is primarily manifested by used of antibiotics. Specific correction by Corvitin and Contrycal led to the growth inhibitory capacity in BAL. Lowering of the protease activity against the growth inhibitory capacity is potentially effective in the correction of inflammatory diseases of the bronchopulmonary system.

### ЗМІНИ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНАЗ ТА ЇХ ІНГІБІТОРІВ ПРИ КОРЕКЦІЇ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАПАЛЕННЯ ЛЕГЕНІВ АНТИБІОТИКАМИ, ІНГІБІТОРАМИ ПРОТЕЇНАЗ ТА АНТИОКСИДАНТАМИ.

**В.В. Щербак, І.І. Фомочкіна, А.В. Кубишкін****РЕЗЮМЕ**

У статті наведено порівняльний аналіз змін показників процесів протеолізу в сироватці крові та бронхоальвеолярному змиві (БАЗ) при експериментальній пневмонії на тлі корекції антибіотиком, інгібітором протеїназ і антиоксидантом. Застосування антибіотику в першу чергу проявлялося зниженням активності еластазо- і трипсиноподібних протеїназ в БАЗ. Специфічна корекція корвітином і контрикалом приводила до зростання інгібіторного потенціалу в БАЗ за рахунок антитриптичної активності. Зниження активності протеїназ на тлі зростання інгібіторного потенціалу є потенційно ефективним при корекції запальних захворювань бронхолегеневої системи.

**Ключевые слова: протеиназы, воспаление легких, антибиотики, антиоксиданты, эксперимент.**

Дисбаланс протеиназ и ингибиторов протеиназ является одним из ведущих механизмов в патогенезе воспаления легких, способствует разрушению легочной ткани и формированию хронической обструктивной болезни легких [1-3].

Ведущая роль протеолитического воздействия в патогенезе бронхолегочных заболеваний служит обоснованием для использования ингибиторов протеиназ и антиоксидантов для лечения бронхолегочной патологии [4, 5]. Однако, препараты для целевой коррекции дисбаланса протеиназ-ингибиторной системы при патологии легких до настоящего времени не разработаны и состояние протеазно-антипротеиназного равновесия не учитывается при проведении фармакотерапии бронхолегочного воспаления препаратами других групп.

В связи с этим особый интерес представляет сопоставление изменений в протеиназ-ингибиторной системе при действии наиболее показанных при лечении воспалительных

заболеваний легких антибиотиков и специфических препаратов с антипротеиназным и антиоксидантным механизмом действия.

Таким образом, цель исследования – провести сравнительный анализ особенностей течения экспериментальной пневмонии на основании изменения параметров протеиназ-ингибиторной системы сыворотки крови и бронхоальвеолярного секрета при фармакологической коррекции течения воспаления легких антибиотиком, ингибитором протеиназ и антиоксидантом.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Экспериментальные исследования проводились на 59 белых крысах-самцах линии Вистар. Животным всех групп повреждение легких моделировали путем введения стерильной капроновой нити диаметром 0,2 мм и длиной 3,5 см в трахею животных.

Крысам первой группы (n=9) для изучения коррекции воспалительного процесса антибактериальным препаратом использовали

бициллин-3 (БЛ) из расчета 500 Ед/100 г массы тела крысы в/м через 3 дня на 4-ый в течение 2 недель, 4 инъекции на курс, внутримышечно. Коррекцию начинали через 2 недели после введения нити и проводили в течение 14 дней. Для изучения влияния ингибиторов протеиназ и антиоксидантов через 2 недели после введения нити начинали лечение препаратами, которое проводили в течение 14 дней, по 10 инъекций на курс, внутривентриально. Крысам второй группы (n=10) вводили контрикал (Кнт) в дозе 10 000 АтрЕД/кг массы, разведенный в изотоническом растворе натрия хлорида, из расчета 10 мл/кг массы. Крысам третьей группы (n=10) вводили корвитин (Крв) в дозе 10 мг/кг массы тела, разведенный в изотоническом растворе хлорида натрия, из расчета 10 мл/кг массы. Крысам четвертой группы (n=10) осуществлялось сочетанное введение контрикала и корвитина через день в указанных дозах. В качестве группы сравнения использовали группу крыс (n=10), у которых экспериментальная пневмония развивалась в течение 1 месяца. Контрольную группу составляло 10 интактных животных.

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasbourg, 18.03.1986). После умерщвления животных под эфирным наркозом производили взятие крови из яремной вены и получали бронхоальвеолярный смыв (БАС) путем промывания легких через трахею 10 мл физиологического раствора.

Для оценки патоморфологических изменений в ткани легких готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином, эозином и пикрофуксином по Ван Гизону, соединительнотканые волокна окрашивались в красный цвет. Просмотр и цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли с помощью светового микроскопа «Olympus CX-41».

В сыворотке крови и бронхоальвеолярном смыве изучали активность протеиназ и их ингибиторов исследовали с использованием энзиматических методов [6] с измерением на спектрофотометре «BioMate 5» (Великобритания). 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- $\alpha$ -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ),  $\alpha_1$ -ингибитор протеиназ ( $\alpha_1$ -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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного курса коррекции при использовании бициллина-3 было установлено, что в сыворотке крови по сравнению с группой без коррекции происходило увеличение эластазоподобной активности на 46,4 % и снижение трипсиноподобной активности на 30,3 %, что сочеталось с тенденциями к повышению  $\alpha_1$ -ИП и понижению кислотостабильных ингибиторов (рис. 1).

При изучении влияния специфической коррекции на течение острого воспаления легких отмечалось понижение эластазоподобной активности на 66,6 % при использовании сочетания корвитина и контрикала по сравнению с контрольной группой, на 77,3% по сравнению с коррекцией корвитином и на 84 % контрикалом. Уровень КСИ при сочетанном применении препаратов увеличивался на 31,4 % по сравнению с контрольной группой, на 39 % и 28,7% по сравнению с группами с применением корвитина и контрикала соответственно.

Наиболее существенные отличия получены в группах с применением бициллина-3 и сочетании корвитина с контрикалом. Установлено, что в сыворотке крови активность эластазоподобных протеиназ в 2 раза меньше при применении специфической коррекции по сравнению с группой, леченной бициллином-3, тогда как уровень ингибиторов существенно не отличался.

Более существенные изменения отмечены в бронхоальвеолярном смыве. Так, при коррекции бициллином-3 выявлено снижение протеолитической активности ЭПА в 4,5 раза, а ТПА более чем в 2 раза; уровень кислотостабильных ингибиторов уменьшался в 3 раза, а АТА имела тенденцию к повышению (рис. 2).

При специфической коррекции в БАС состояние показателей системы протеолиза характеризовалось снижением уровня эластазоподобных протеиназ и увеличением АТА и КСИ. Уровень ЭПА достоверно понижался при применении контрикала на 56,6 %, тогда как при его сочетании с корвитином происходило более выраженное его уменьшение, на 94,9 % по сравнению с контрольной группой. Уровень ТПА оставался высоким, однако его максимальное снижение имело место при сочетанном применении корвитина и контрикала. Антитриптическая активность была повышена во всех группах, достоверно увеличиваясь при коррекции контрикалом в 2 раза, а при сочетании контрикала с корвитином почти в 3 раза. Кислотостабильные ингибиторы повышались при комбинированном применении препаратов более чем в 2 раза, а при

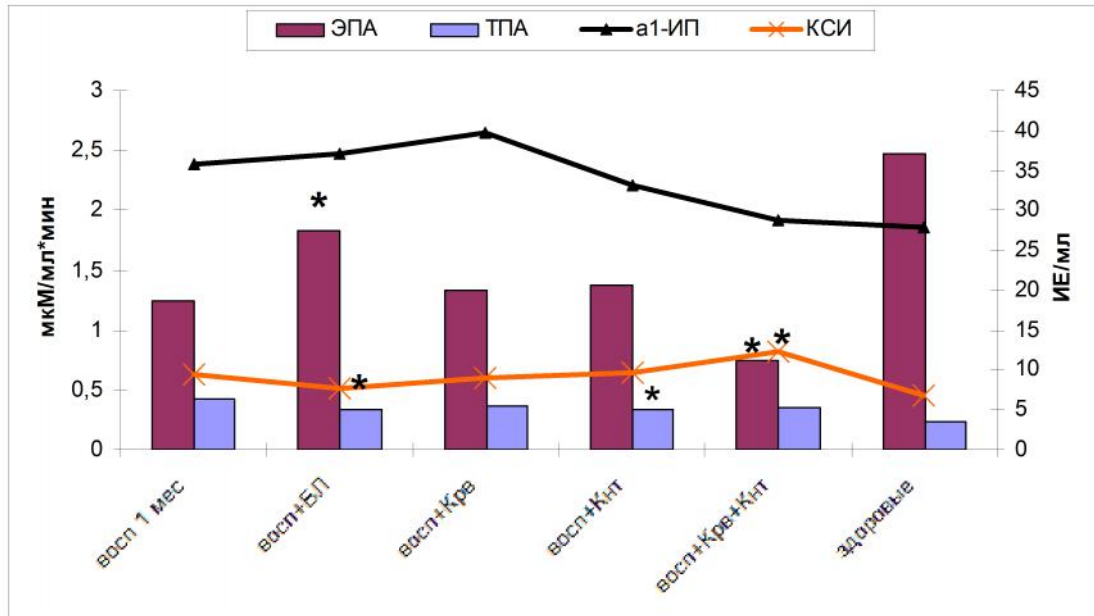


Рис. 1. Влияние коррекции на состояние показателей протеолиза в сыворотке крови крыс с острой экспериментальной пневмонией.

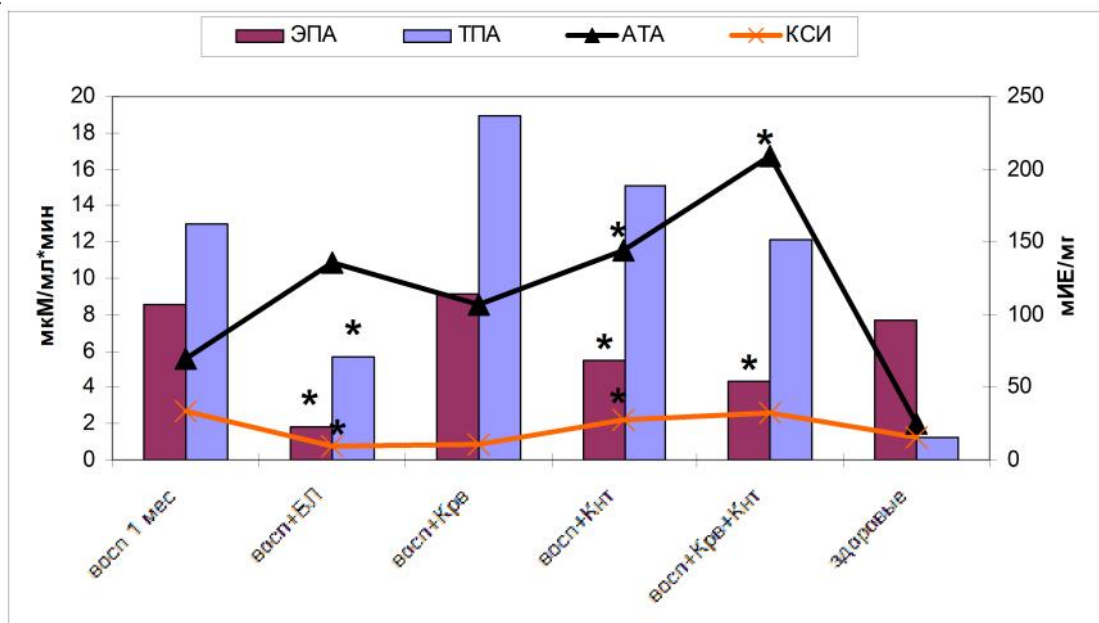


Рис. 2. Влияние коррекции на состояние показателей протеолиза в бронхоальвеолярном смыве крыс с острой экспериментальной пневмонией

применении только контрикала наблюдалась лишь тенденция к повышению. Так, наиболее существенное влияние на систему протеиназ и их ингибиторов оказывало сочетанное применение ингибитора протеиназ и антиоксиданта.

Сопоставление результатов полученных при применении бициллина-3 и комбинации корвитина с контрикалом показало, что при применении бициллина-3 на местном уровне наблюдалось более выраженное уменьшение протеолитической активности со снижением ЭПА в 3 раза и ТПА в 2 раза. Высокий уровень ингибиторов протеиназ имел

место при применении комбинации корвитина и контрикала, причем при сравнении с группой, леченной бициллином-3, уровень КСИ повышался в 3 раза.

Таким образом, при применении антибиотика для коррекции течения экспериментального воспалительного процесса в легких эффект, в первую очередь, проявлялся снижением активности эластазо- и трипсиноподобных протеиназ, что, вероятно, может быть связано с уменьшением бактериальной обсемененности и, соответственно, снижением инфильтрации и активности фагоцитов, являющихся

основным источником неспецифических протеиназ.

Эффективность специфической коррекции с применением ингибиторов протеиназ и антиоксидантов, направленной на устранение дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе, обусловлена в большей мере увеличением ингибиторного потенциала, что может быть связано как с увеличением содержания ингибиторов, так и с протекторной ролью антиоксидантов, предохраняющих ингибиторы от потери активности вследствие окисления.

Исходя из полученных данных, можно сделать заключение, что наиболее эффективный подход к коррекции воспаления легких может наблюдаться при сочетании антибактериальной терапии со специфической коррекцией дисбаланса протеиназ и их ингибиторов.

#### ВЫВОДЫ

1. Применение антибактериального препарата бициллина-3 сопровождается снижением острой воспалительной реакции в сыворотке крови, а в БАС в большей степени характеризуется уменьшением эластазо- и трипсиноподобной активности.

2. Применение корвитина и контрикала сопровождается уменьшением активности протеиназ и ростом КСИ в сыворотке крови, а в БАС происходит в основном увеличение ингибиторного потенциала за счет роста антитриптической активности.

3. Обоснована потенциальная эффективность применения сочетания антибиотиков, ингибиторов

протеиназ и антиоксидантов в лечении воспалительных заболеваний бронхолегочной системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. Fischer B.M., Pavlisko E., Voynow J.A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2011. – V. 6. – P. 413-421.

3. 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.

4. Van der Poll T., Opal S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia // *Lancet.* – 2009. – V. 374. – P. 1543-1556.

5. Neurohr C, Behr J. Diagnosis and therapy of interstitial lung diseases. *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 2009. – V. 134. – P. 524-529.

6. Кубишкін А. В., Харченко В. З., Семенець П. Ф. та ін. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (Методичні рекомендації) // Установа-розробник: Державна установа «Кримський державний медичний університет ім. С. І. Георгієвського» МОЗ України, Київ 2010. – 28 с.