

На правах рукописи



АКБАШЕВА ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

**ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ
ПЛАЗМЕННОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА**

14.03.03 - патологическая физиология

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Томск - 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор биологических наук, профессор Суханова Галина Алексеевна
доктор медицинских наук, профессор Серебров Владимир Юрьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Агафонов Владимир Иванович
доктор медицинских наук, профессор Кондакова Ирина Викторовна
доктор медицинских наук, профессор Высокогорский Валерий Евгеньевич

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__»_____ 2011 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «__»_____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

И. В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение общих патогенетических механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенного фактора является одной из актуальных медико-биологических проблем. Протеолиз представляет особую форму биологического контроля, включает протеолитические ферменты, их неактивные предшественники, активаторы и ингибиторы, обеспечивает гомеостаз в норме и при развитии адапционно-защитных реакций организма [Локшина Л.А., 2001; Carretero O.A., 2005; Purkayastha P. et al., 2005]. При неуправляемом протеолизе происходит деструкция клеток, активация систем свертывания, фибринолиза, комплемента и кининогенеза [Веремеенко К.Н., 1994; Яровая Г.А., 2001; Abboud R.T., 2008; Steinhoff M.L. et al., 2005]. Протеолитические ферменты плазмы крови и тканей организма, как правило, способны усиливать действие на организм патогенных факторов: бактерий, вирусов [Alcorn J.F. et al., 2004], токсических веществ окружающей среды [Букреева Е.Б., 2003; Fehrenbach H., 2003], что сопровождается патологией бронхо-легочной системы [Shapiro S.D. et al., 2003; Onclinx C. et al., 2006; Davies P.L. et al., 2010], желудочно-кишечного тракта [Harada N. et al., 2001; Исламова Е.А., 2004], развитием онкологических заболеваний [Yang P. et al., 2004; Michael I. P. et al., 2005; Lindner I. et al. 2010].

В регуляции протеолитических процессов принимают участие ингибиторы внутриклеточных и внеклеточных протеиназ, действие которых достаточно хорошо изучено [Веремеенко К.Н., 1994; Локшина Л.А., 2001; de Roos B., 2008]. Ингибиторы протеиназ обладают противовоспалительным, антибактериальным, противовирусным и противоопухолевым действием [Na G.Y., 2004; He S.H., 2004]. Выявлено большое количество вариантов реагирования ингибиторов протеолиза: от повышения их активности [Gangadharan B. et al., 2007; White I.R. et al., 2007; Aiglova K. et al., 2007; de Roos B. et al., 2008; He Q.Y. et al., 2008], до снижения [Crowther D.C. et al., 2004; Gooptu B. et al., 2008] и разнонаправленной реакции [Осипов В.Д., 2006; Петросян А.М. с соавт., 2007; Zelvyte I. et al., 2003]. Длительное повышение экспрессии ингибиторов протеиназ способствует старению организма [Pletcher S.D. et al., 2002]. Неоднозначность оценки роли ингибиторов протеолиза в реакциях адаптации и развития патологических

процессов приводит к значительным трудностям при использовании их в качестве диагностических и прогностических критериев.

Установлено, что ингибиторная активность плазмы крови на 95% представлена α_1 -протеиназным ингибитором (α_1 -ПИ) и α_2 -макроглобулином (α_2 -МГ). α_1 -ПИ относится к серпинам, известны полиморфные варианты гена [Пузырев В. П., Савюк В. Я., 2002; Silverman G.A. et al., 2001]. Генетический дефект α_1 -ПИ способствует развитию эмфиземы, хронической обструктивной болезни легких, фиброза печени с прогрессией к циррозу [Fumagalli M., 2008; Abboud R.T., 2008; Camelier A.A., 2008; Fregonese L., 2008]. Тем не менее, в ряде случаев обнаружены бессимптомные варианты дефицита α_1 -ПИ с поздней манифестацией заболеваний легких и печени [Головюк Е.Л., 2002; Sotcan M., 2006; Hogarth D.K., 2008; Ferrarotti I., 2008]. Известны также многочисленные функции α_2 -МГ: ингибирование протеиназ, активация внутриклеточных путей сигнальной трансдукции, регуляция иммунной системы [Зорин Н.А., 2004; Misra U.K. et al., 2005; Suriyaprom K., 2007]. Однако функция α_2 -МГ четко не определена: его иногда относят к белкам острой фазы воспаления, про-, антиапоптотическим факторам, белкам теплового шока, внеклеточным шаперонам, радиопротекторам [Зорин Н.А. и др., 2004; Robert J. et al., 2005; Uskoković A., 2007; Mihailovic M. et al., 2009].

Тканевые кислотостабильные ингибиторы (КСИ) представляют альтернативный путь регуляции внутриклеточного протеолиза по отношению к высокомолекулярным, плазменным ингибиторам [Оглоблина О.Г., 2000; Doumas S. et al., 2005; Zhuo L., 2004]. КСИ обнаружены во многих тканях, обладают антибактериальными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами [Doumas S. et al., 2005; Bellemare A. et al., 2008; Reviglio V.E. et al., 2009]. Приводятся противоречивые данные о функциях КСИ при патологических процессах: их рассматривают как положительно, так и отрицательно реагирующими белками острой фазы [de la Motte et al., 2003; Opal S.M. et al., 2007; Wang Z. et al., 2008].

В последние годы большое внимание уделяется изучению роли ингибиторов протеолиза в биологических жидкостях [Nie J. et al., 2004; Zelvyte I. et al., 2004; Bizeto L. et al., 2008]. Плазменные ингибиторы обнаруживаются в секрете бронхов, желчи, спинномозговой и околоплодной жидкостях, дуоденальной слизи [Hettinger A.M. et al., 2001; Vila N. et al., 2003; Doumas S. et al., 2005; Lea R.G. et al., 2007]. Значимость ингибиторов в

регуляции внутриклеточного протеолиза при развитии патологических процессов остается не изученной.

В связи с этим актуальным является комплексное исследование активности α_1 -ПИ, α_2 -МГ и КСИ, их взаимосвязи с клеточным метаболизмом, процессами адаптации к действию повреждающих факторов.

Цель исследования: изучить активность α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ биологических жидкостей, взаимосвязь с показателями метаболизма клетки, охарактеризовать варианты реагирования ингибиторов протеиназ при адаптивных и патологических процессах, сопровождающихся активацией плазменного и внутриклеточного протеолиза.

Задачи исследования:

1. Изучить активность α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ в плазме крови, секретах слюнных желез, индуцированной мокроты, межтканевой жидкости практически здоровых лиц, связь с активностью протеиназ и биохимическими маркерами состояния внутренних органов: аспартат-, аланинаминотрансферазами, α -амилазой, 5'-нуклеотидазой, мочевиной, липидами, окислительными процессами, синтеза и деградации белков соединительной ткани.

2. Охарактеризовать ингибиторную активность плазмы крови, индуцированной мокроты, кожного экссудата, а также активность эластазо-, трипсиноподобных протеиназ, состояние кининогенеза, перекисного окисления липидов при заболеваниях бронхо-легочной системы: хронической обструктивной болезни легких и атопической бронхиальной астме.

3. Оценить активность ингибиторов на фоне активации плазменного и внутриклеточного протеолиза слюнных желез, слизистой кишечника, ткани печени и окислительной модификации белков при заболеваниях желудочно-кишечного тракта: синдроме раздраженного кишечника, язвенной болезни, язвенном колите, болезни Крона и фиброзе печени.

4. Выявить взаимосвязь ингибиторной активности с фенотипом α_1 -ПИ, типом конституции больных, показателями деградации соединительной ткани и коллагенообразования, перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков.

5. Изучить роль ингибиторов при травмах кости, их взаимосвязь с активностью трипсиноподобных протеиназ, содержанием липидов, а также

влияние контрикала на состояние протеолиза, перекисное окисление липидов, резорбцию костной ткани и остеогенез.

6. Оценить особенности реакции ингибиторов при онкологических заболеваниях человека. В условиях экспериментального опухолевого роста *in vivo* и *in vitro* выявить эффект контрикала по отношению к протеолитическим ферментам клеток мастоцитомы Р-815, печени, тимуса.

Научная новизна. Проведено комплексное исследование активности α_1 -ПИ, α_2 -МГ и КСИ в биологических жидкостях в норме при адаптивных реакциях и заболеваниях, сопровождающихся активацией плазменного и внутриклеточного протеолиза. В рамках концепции согласованного действия ингибиторов протеиназ выявлены варианты их реагирования: адаптивный, дефицит и дисбаланс ингибиторов, коррелирующие со степенью активации протеолиза, перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков и деградацией соединительной ткани. Впервые установлено, что адаптивный вариант характеризуется увеличением активности α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ и сопровождается умеренной активацией протеолиза. Дефицит α_1 -ПИ и α_2 -МГ приводит к более выраженной активации протеолитических процессов при хронических заболеваниях бронхо-легочной системы, желудочно-кишечного тракта. Дисбаланс ингибиторов с повышением коэффициента α_1 -ПИ/ α_2 -МГ и низкой активности α_2 -МГ характерен для фиброза печени и онкологических заболеваний. Ингибирование плазменного протеолиза путем внутривенного введения контрикала увеличивает активность α_1 -ПИ, α_2 -МГ, снижает липолиз, перекисное окисление липидов, резорбцию и стимулирует остеогенез, приводит к торможению опухолевого роста.

Впервые дана оценка роли ингибиторов в индуцированной мокроте, являющейся секретом бокаловидных клеток, слюны, кожного экссудата, представляющего межтканевую жидкость, слизистой кишечника, ткани печени. Ингибиторная активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ в биологических жидкостях значительно ниже, чем в плазме крови. Активность КСИ в кожном экссудате практически не отличается от активности ингибитора в плазме крови. Установлено, что активность α_1 -ПИ и КСИ плазмы крови коррелирует с показателями в слюне и кожном экссудате, в то время как активность α_2 -МГ плазмы крови не зависит от ингибиторных свойств других биологических жидкостей.

Новыми являются данные о том, что при хронических воспалительных заболеваниях с активацией плазменного и внутриклеточного протеолиза в первую очередь развивается дефицит α_1 -ПИ. Одновременное снижение активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ плазмы крови и тканей сопровождается тяжелыми заболеваниями бронхо-легочной системы и деструктивными повреждениями кишечника. Универсальной реакцией при сдвиге метаболизма в сторону катаболических процессов является увеличение активности КСИ, которые в условиях дефицита антипротеиназных, защитных факторов осуществляют контроль плазменного и внутриклеточного протеолиза.

Теоретическая и практическая значимость. Получены данные фундаментального характера, расширяющие представления о роли ингибиторов протеолиза в регуляции метаболических процессов плазмы крови и тканей организма. Выявление вариантов реагирования ингибиторов при заболеваниях бронхо-легочной системы и желудочно-кишечного тракта может быть использовано для оценки состояния больных, хронизации патологического процесса. Перспективным является изучение активности ингибиторов и протеиназ индуцированной мокроты в качестве неинвазивных показателей при заболеваниях бронхо-легочной системы. Снижение активности α_1 -ПИ индуцированной мокроты курящих лиц рекомендовано использовать как маркер прогрессирования хронической обструктивной болезни легких. Дефицит α_2 -МГ плазмы крови является фактором риска фиброза и развития цирроза печени.

Полученные результаты являются основой для разработки новых подходов к лечению хронических воспалительных заболеваний с использованием лекарственных средств, обладающих способностью снижать активность внутриклеточных и плазменных протеиназ и повышать активность их ингибиторов. Возможность практического использования полученных данных подтверждена патентами РФ.

Положения, выносимые на защиту

1. Активация плазменного и внутриклеточного протеолиза при патологических процессах сопровождается разными вариантами реагирования ингибиторов протеиназ: адаптивный, дефицит и дисбаланс. Адаптивный вариант с увеличением активности α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ проявляется при умеренной активации катаболических процессов. Дефицит

α_1 -ПИ и α_2 -МГ связан с выраженной активацией протеолиза, окислительной модификацией белков, деградацией соединительной ткани. Дисбаланс ингибиторов характеризуется повышением активности α_1 -ПИ и снижением активности α_2 -МГ. При дефиците и дисбалансе α_1 -ПИ и α_2 -МГ протеолиз находится под контролем КСИ.

2. Максимальная активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ характерна для плазмы крови, в кожном экссудате, слюне, индуцированной мокроте она составляет от 0,4% до 11% от показателей плазмы крови. Согласованное действие ингибиторов направлено на регуляцию активности как плазменных, так и внутриклеточных протеиназ: трипсиноподобных, эластазы, коллагеназы, катепсина D.

3. Наиболее значимыми показателями являются α_1 -ПИ и α_2 -МГ, которые имеют определяющее значение для прогнозирования заболеваний бронхолегочной системы и желудочно-кишечного тракта. Нарушение баланса между α_1 -ПИ и α_2 -МГ увеличивает риск развития фиброза печени, рака легких, желудка. Повышение активности α_2 -МГ под действием контрикала определяет его противоопухолевый эффект.

Внедрение в практику. Основные результаты работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии, биохимии и молекулярной биологии, терапии, госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. По результатам работы получено 3 патента на изобретение «Способ диагностики стадии хронизации гепатита» (№ 2291440, 10.01.2007); «Способ диагностики цирроза печени» (№ 22914441, 10.01.2007); «Способ прогнозирования риска развития хронической обструктивной болезни легких у длительно курящих лиц» (№ 2359618, 27.06. 2009). Отдельные фрагменты работы поддержаны грантом ФЦП № 02.740.11.0083 «Разработка научно-технологической основы применения лазерных технологий в биомедицинских исследованиях, эффективных методов экспресс-диагностики основных социально-значимых заболеваний респираторной системы человека с использованием методов лазерной спектроскопии».

Апробация работы. Основные положения работы докладывались на ежегодных конференциях «Национальные дни лабораторной медицины» 1997-2008 гг., конференции молодых ученых России с международным участием (Москва, 1998), межрегиональной научно-практической

конференции «Медицина и экологические проблемы Северных районов Сибири» (Стрежевой, 1998), на съездах физиологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 1997, Томск, 2000, 2002), на 5 национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2005), 6 международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2005), 12 Российской гастроэнтерологической неделе (Москва, 2006), 8 Международном Славяно-Балтийском научном гастроэнтерологическом форуме (Санкт-Петербург, 2006), III конгрессе евроазиатского респираторного общества (Астана, 2007), IV съезде и конференции Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008, Челябинск, 2009).

Результаты работы обсуждались на научных семинарах кафедр биохимии и молекулярной биологии СибГМУ, патофизиологии, на проблемных комиссиях «Актуальные проблемы патологической физиологии и общей патологии» и «Фундаментальные проблемы физиологии, биофизики, биохимии» Сибирского государственного медицинского университета (Томск, 2005, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликована 61 работа, в том числе 1 монография и 22 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикаций результатов исследований на соискание степени доктора медицинских наук.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 235 страницах, содержит 82 таблицы, 29 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения и выводов. Список литературы включает 461 источников, из них 95 отечественных и 366 иностранных.

Личный вклад автора. Автором определены цель, задачи, объём исследований, выбраны объекты и методы исследования, проведен аналитический обзор литературы. Более 90% фактического материала получено непосредственно автором. Анализ и обобщение полученных данных, формирование выводов и положений полностью выполнено лично автором.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика обследованных групп

Проведено проспективное, сравнительное исследование, включающее 1634 человек, обследованных в период с 1993-2009 год. Дизайн исследования представлен на рис.1.

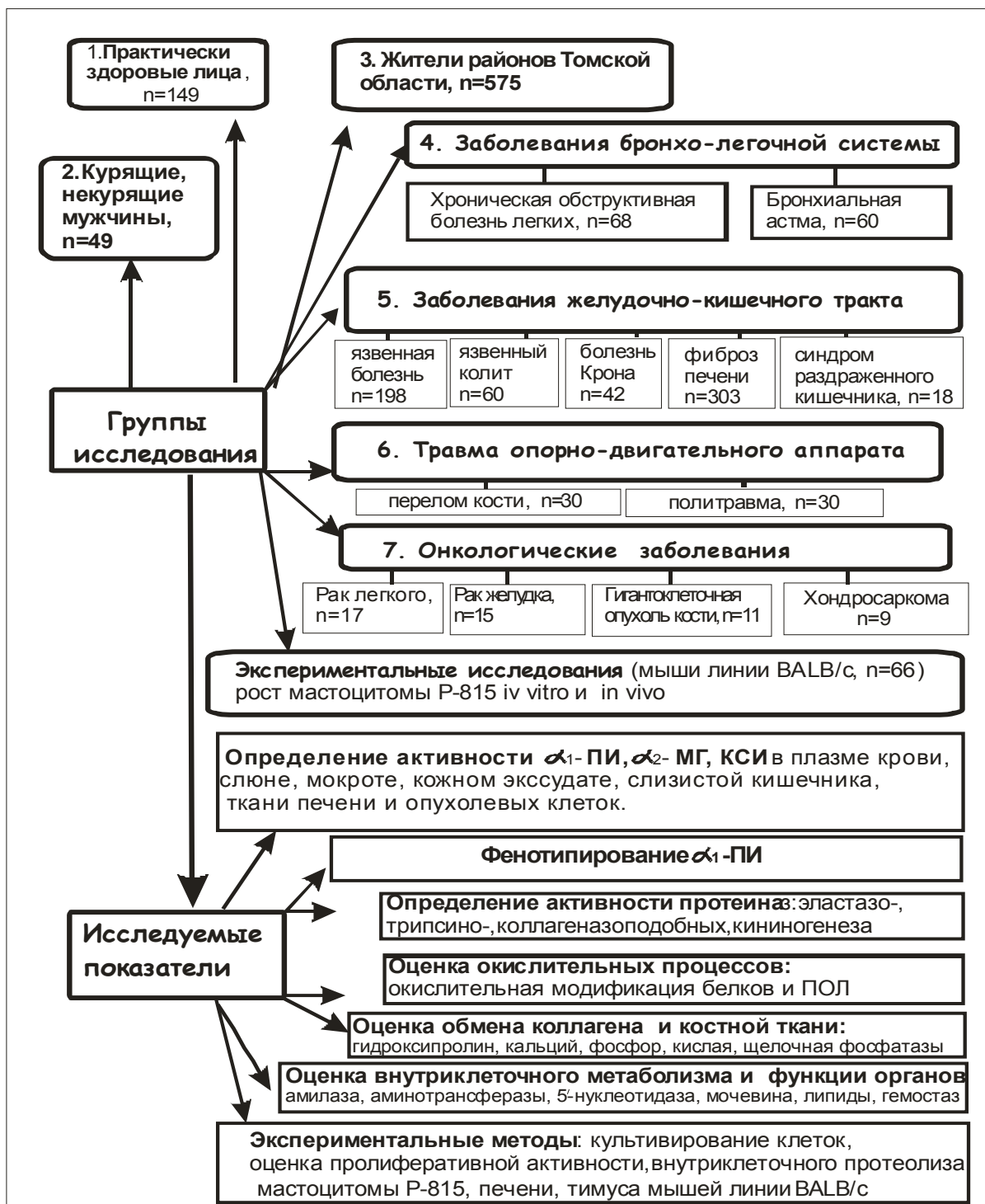


Рис. 1. Дизайн исследования

Критерии включения в исследование:

1. Информированное согласие участников.
2. Для практически здоровых лиц (группа 1) - отсутствие острых

респираторных, хронических, онкологических заболеваний, язвенного и кашлевого анамнеза: 50 женщин, 69 мужчин в возрасте $40,6 \pm 6,7$ лет и 30 детей (14 девочек и 16 мальчиков) в возрасте $12,3 \pm 4,3$ лет. **Группу 2** составили 29 курящих (индекс курения $34,9 \pm 1,4$ пачка/лет) и 20 некурящих мужчин в возрасте $44,1 \pm 7,4$ и $38,5 \pm 6,3$ лет. **В группу 3** включены 207 взрослых и 368 детей, участвовавших в программе по оценке здоровья населения Томской области в 1993-1994 г.

3. Заболевания бронхо-легочной системы (**группа 4**), верифицированные согласно критериям GOLD 2003-2007. Группа пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) на 90% была представлена мужчинами, средний возраст $50,8 \pm 15,3$ лет. Атопическая бронхиальная астма установлена у 45 женщин и 15 мужчин, в возрасте от 18 до 55 лет.

4. Заболевания желудочно-кишечного тракта (**группа 5**), верифицированные в соответствии с МКБ-10. Диагноз язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки установлен у 47 мальчиков и 41 девочки в возрасте от 8 до 15 лет (*H. pylori*-ассоциированная - у 80 детей) и 110 взрослых (*H. pylori*-ассоциированная - у 101 пациента), средний возраст которых составил $39,5 \pm 0,94$ лет. Среди взрослых больных 17 человек имели гипер-, 38 - нормо- и 55 - астенический тип конституции. Язвенный колит легкой степени тяжести выявлен у 24 человек, средней степени - у 26, тяжелой степени - у 10 пациентов; болезнь Крона легкой степени тяжести - у 17 больных, средней - 12, тяжелой - у 13 человек. В качестве группы сравнения обследовано 18 человек в возрасте 20-30 лет с синдромом раздраженного кишечника. Среди пациентов с фиброзом печени у 109 человек была I стадия заболевания, у 87 - II, у 33 - III, у 74 человек - IV стадия (цирроз).

5. Травма опорно-двигательного аппарата (**группа 6**): 42 мужчины и 18 женщин в возрасте от 20 до 52 лет: 30 человек с переломом кости и 30 человек - с множественными травмами. В комплексное лечение 15 человек из каждой подгруппы включали контрикал в дозе 30000 ЕД в течение 3 дней.

6. Онкологические заболевания (**группа 7**): 17 человек с опухолью легкого III стадии (у 4 больных выявлен плоскоклеточный рак умеренно дифференцированный, 3 - мелкоклеточный плеоморфный, 2- смешанный, у 8 - крупноклеточный рак); 15 пациентов с раком желудка III стадии (аденокарцинома); 11 человек с литической стадией гигантоклеточной

опухолью кости (ГКОК) и 9 больных с диагнозом хондросаркома III степени злокачественности, для которой характерна глубокая анаплазия.

Критерии исключения:

1. Наличие тяжелых сопутствующих заболеваний, острых или обострение хронических сопутствующих заболеваний.
2. Терапия глюкокортикоидами и нестероидными противовоспалительными препаратами на момент госпитализации.
3. Противовирусное лечение в анамнезе.
4. Инфекционные заболевания кишечника.
5. Наличие заболеваний опорно-двигательного аппарата с детского возраста, что могло бы повлиять на формирование типа телосложения.

Активность ингибиторов и протеиназ определяли в плазме крови, слюне, кожном экссудате, индуцированной мокроте, ткани печени и слизистой кишечника. Изучали показатели перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков, деградации коллагена, фиброгенеза, фосфорно-кальциевого, липидного обмена, маркеров состояния печени, почек, поджелудочной железы, показатели гемостаза при выполнении локальной гипоксии путем передавливания предплечья манжетой сфигмометра.

Кожный экссудат получали путем экспозиции камеры с 0,9% раствором NaCl на коже предплечья. Индуцированную мокроту собирали после последовательно проводимых ингаляций раствора NaCl посредством ультразвукового небулайзера. Биоптаты ткани печени и слизистой оболочки кишечника были взяты с помощью чрескожной пункционной биопсии и колонофиброскопии, соответственно.

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием 66 мышей линии BALB/c, самцов, весом 18-20 г. Клетки мастоцитомы P-815 перевивали внутрибрюшинно. На 7 сутки роста опухоли мышам внутривенно вводили контрикал в дозе 750 Ед и через 2, 4, 6 часов, 1 сутки, 3 и 7 суток изучали показатели протеолиза в плазме крови и тканях животных. Активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ, катепсина D, эластазо- и трипсиноподобных протеиназ определяли через 2, 6, 24 и 72 часа инкубации культуры клеток мастоцитомы P-815 *in vitro*. Пролиферативную активность опухолевых клеток оценивали по интенсивности включения H^3 -тимидина в ДНК клеток [Хоробрых В.В. и соавт., 1983].

Методы исследования

Активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ определяли спектрофотометрическим методом Т.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной (1979) по торможению гидролиза трипсином синтетического субстрата N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ, ICN, Biomedicals Inc, USA). Активность КСИ определяли после обработки плазмы 4,2% раствором HClO_4 [Оглоблина О.Г. и соавт., 1984]. Активность ингибиторов рассчитывали в условных ингибиторных единицах (ИЕ/мл). Фенотипирование α_1 -ПИ проводили методом изоэлектрического фокусирования [Король Л.Е. и соавт., 1986].

Активность эластазоподобных и трипсиноподобных протеиназ определяли по гидролизу синтетических субстратов: N-бутил-оксикарбонил-L-аланин-p-нитрофенилового эфира (ICN, Biomedicals Inc, USA) и БАЭЭ; активность коллагеназоподобных протеиназ измеряли по расщеплению коллагена I типа (Sigma, Germany) и выражали в мкмоль образующегося гидроксипролина [Шараев П.Н. и соавт., 1987]; для катепсина D использовали в качестве субстрата гемоглобин, для липазы – оливковое масло [Комаров Ф.И. с соавт., 1976; Меньшиков В.В., 1987]. Активность кининогеназы оценивали методом Пасхиной Т.С., Кринской А.В. по скорости гидролиза БАЭЭ, 5'-нуклеотидазы - по гидролизу аденозинмонофосфата.

Окислительную модификацию белков оценивали по содержанию карбонильных и битирозиновых производных [Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., 2000]. Перекисное окисление липидов изучали по содержанию ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов [Камышников В.С., 2001]. Активность каталазы и супероксиддисмутазы определяли в соответствии с методами М.А. Королюк (1988) и О.С. Брусова с соавторами (1976).

Содержание свободного, пептидно- и белковосвязанного гидроксипролина измеряли по цветной реакции с диметиламинобензальдегидом [Шараев П. Н., 1981]. Содержание кальция, фосфора, мочевины, активность кислой и щелочной фосфатаз, α -амилазы, аланин- и аспартат-аминотрансфераз определяли с помощью диагностических наборов Lachema (Чехия) и Вектор-Бест (Новосибирск). Гемостаз оценивали на анализаторе реологических свойств АРП-01 фирмы «Меднорд» (Томск). Содержание фракций липидов измеряли методом тонкослойной хроматографии на пластинке «Силуфол» (Чехия) [Камышников В.С., 2001].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel» для OS «Windows XP», «Statistica 6.0», SPSS 11,5. Использовали критерии согласия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилка, Стьюдента, Манна-Уитни, Вилкоксона, Краскала-Уоллиса и Ньюмена-Кейлса, корреляционные методы Пирсона и Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Многомерный статистический анализ проводили с помощью дискриминантного метода и бинарной логистической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Регуляция протеолиза осуществляется за счет согласованного действия ингибиторов протеиназ, отличающихся по механизму связывания ферментов, обеспечивающих разную степень их активности в биологических жидкостях человека. Нарушение взаимодействия ингибиторов и протеиназ определяет течение патологического процесса и прогноз заболевания.

Анализ активности ингибиторов и протеиназ в биологических жидкостях практически здоровых лиц показал, что в плазме крови наблюдается высокая активность α_1 -ПИ; активность α_2 -МГ и КСИ составляет, соответственно, 12,5% и 1% от значений α_1 -ПИ. В других биологических средах активность ингибиторов находится в пределах 0,4-11,2% от показателей плазмы крови (табл. 1).

Таблица 1

Активность ингибиторов в биологических жидкостях, ($X \pm m$)

Биологические жидкости	α_1 -ПИ, ИЕ/мл	α_2 -МГ, ИЕ/мл	КСИ, ИЕ/мл
Плазма крови, n=21	27,50±0,90	3,90±0,50	0,20±0,09
Кожный экссудат, n=21	0,47±0,02 p<0,05	0,46±0,01 p<0,05	0,25±0,01 p>0,05
Слюна, n=21	0,22±0,08 p<0,05	0,05±0,02 p<0,05	0,03±0,01 p<0,05
Индукцированная мокрота n=20	0,14±0,06 p<0,05	0,02±0,01 p<0,05	0,02±0,01 p<0,05

Примечание: в таблицах X - среднее, m - стандартное отклонение;
p – статистическая значимость отличий по сравнению с плазмой крови

α_1 -ПИ имеет низкую молекулярную массу, в связи с чем он обнаруживается в секрете бронхов, спинномозговой жидкости, слезах, дуоденальной слизи [Веремеенко К.Н., 1994; He S.H. et al., 2004; Wex T.

et al., 2008]. α_2 -МГ, молекулярная масса которого составляет 780 кДа, проникает в ткани только при повреждении биологических барьеров, как правило, при воспалении [Widegren H. et al., 2008; Chang C.C. et al., 2008]. Очевидно, поэтому у практически здоровых лиц активность α_2 -МГ в слюне, индуцированной мокроте низкая.

Активность КСИ в плазме крови и кожном экссудате одинакова. В слюне и индуцированной мокроте она составила, соответственно, 15% и 10% от активности плазмы крови. КСИ в данных биологических средах, очевидно, представлены, как плазменными производными интер- α -ингибитора трипсина, так и тканевыми местносинтезируемыми ингибиторами [Doumas S. et al., 2005; He S.H. et al., 2003].

Система протеолиза является достаточно чувствительной к локальной гипоксии, курению, воздействию факторов экологического риска. При локальной гипоксии увеличивается время свертывания, в крови повышается активность трипсина в 1,4 раза, калликреина в 1,9 раз и α_1 -ПИ в 1,4 раз. При курении также увеличивается активность ингибиторов и протеиназ. В индуцированной мокроте, являющейся продуктом деятельности бокаловидных клеток воздухоносных путей, происходит активация трипсина, α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ, соответственно, в 4,4; 2,4; 1,3 и в 2,5 раза относительно некурящих лиц (табл. 2).

Таблица 2

Активность ингибиторов, протеиназ и перекисное окисление липидов в индуцированной мокроте курящих мужчин, ($X \pm m$)

Показатели	Некурящие, n=20	Курящие, n=29	p
α_1 -ПИ, ИЕ/мл	0,14 \pm 0,04	0,34 \pm 0,04	<0,05
α_2 -МГ, ИЕ/мл	0,07 \pm 0,009	0,09 \pm 0,004	<0,05
КСИ, мИЕ/мл	10,41 \pm 1,39	25,30 \pm 2,20	<0,05
Трипсин, нмоль БАНЭ/мин мл	0,42 \pm 0,05	1,84 \pm 0,30	<0,05
Эластаза, нмоль БАНЭ/мин мл	0,57 \pm 0,02	0,62 \pm 0,01	>0,05
МДА, мкмоль/мл	0,85 \pm 0,23	2,95 \pm 0,54	<0,05
Каталаза, мккатал/л	148,2 \pm 24,2	50,87 \pm 9,96	<0,05
СОД, Ед/мл	10,58 \pm 1,09	10,68 \pm 0,81	>0,05

p - значимость различий между группами

Активация протеиназ и ингибиторов сопровождается повышением содержания МДА и снижением активности каталазы. Увеличение активности

протеиназ и содержания ТБК-активных продуктов характеризует усиление катаболических процессов слизистой бронхов под действием компонентов табачного дыма. Повышение активности α_1 -ПИ может защищать от апоптоза клетки бронхов в ответ на воздействие табачного дыма [Чучалин А.Г., 2008; Aldonyte R. et al., 2008].

Ингибиторы протеолиза являются чувствительными индикаторами при воздействии экологически неблагоприятных условий среды. По данным мониторинга окружающей среды одним из факторов загрязнения территории Томской области является совместное воздействие радиоактивных и химических веществ [Рихванов Л.П. с соавт., 2006]. У населения, проживающего в зонах экологического риска, обнаруживаются заболевания желудочно-кишечного тракта, верхних дыхательных путей, кожи, почек, щитовидной железы [Матковская Т.В., 2004].

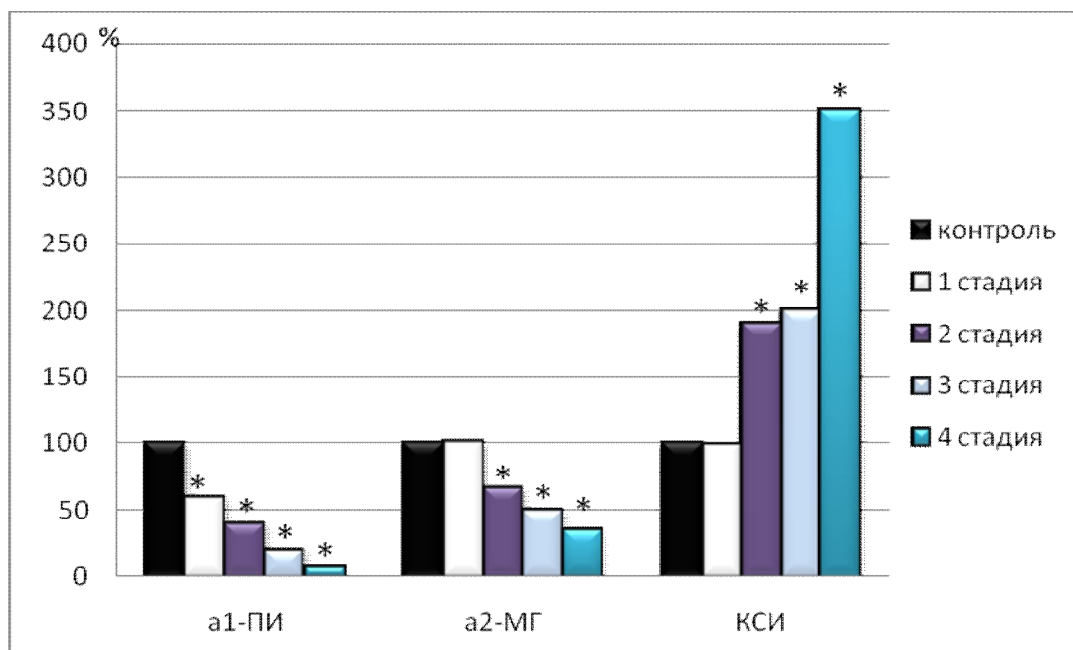
У лиц из экологически загрязненных населенных пунктов наблюдалось увеличение активности α_1 -ПИ, α_2 -МГ в 1,5-1,6 раза по сравнению с жителями районов, не входящих в зону влияния Сибирского химического комбината. Кроме того у жителей этих районов повышалась активность аминотрансфераз, 5'-нуклеотидазы, соответственно, в 1,4 и в 2,6 раз, что отражает повреждение мембран клеток. Особое значение имеет тот факт, что у лиц, проживающих на территории с повышенным радиационным фоном, обнаружено снижение активности α -амилазы до $2,3 \pm 0,4$ мккат/л (референтные значения 16-33 мккат/л), что является признаком недостаточности поджелудочной железы и нарушения пищеварения. У 25% населения обнаружена низкая активность α_1 -ПИ, активность α_1 -МГ была понижена у 14% обследованных лиц.

Таким образом, ингибиторы протеиназ обладают защитным действием при активации протеиназ в условиях адаптации здорового человека к локальной гипоксии, курению, экологическим факторам риска развития заболеваний. Низкая активность ингибиторов протеиназ может быть показателем нарушений метаболизма, приводящих к развитию заболеваний.

Ингибиторы протеиназ при заболеваниях бронхо-легочной системы

Содержание ингибиторов протеолиза определяли в мокроте пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ в мокроте больных снижается в зависимости от степени тяжести

заболевания и на IV стадии составляет, соответственно, 7% и 35% от контрольных значений (рис.2).



*- статистическая значимость отличий от контроля, $p < 0,05$

Рис. 2. Активность ингибиторов протеиназ в индуцированной мокроте пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

Активность КСИ в мокроте, начиная с II стадии болезни, повышается и на IV стадии была в 3,5 раза выше контроля. Прогрессирование заболевания сопровождается возрастанием в индуцированной мокроте активности эластазо-, трипсиноподобных протеиназ и калликреина в 8,8; 2,5 и в 20 раз, соответственно, по отношению к контролю. В плазме крови больных ХОБЛ активность эластазоподобных протеиназ, α_2 -МГ и КСИ, повышается в 1,9; 1,2 и 1,4 раза, соответственно.

Увеличение активности эластазоподобных протеиназ, способных повреждать эластиновые волокна соединительной ткани легких, является одним из основных факторов развития обструктивного синдрома [DiCamillo S.J.et al., 2006]. В этом плане возрастание активности α_2 -МГ и КСИ плазмы крови рассматривается как защитная реакция, направленная на ограничение действия протеиназ. Следует отметить, что активность α_1 -ПИ плазмы крови увеличивалась лишь у 28% обследованных лиц, для 47% больных ХОБЛ характерно снижение активности α_1 -ПИ.

Сдвиг метаболизма в сторону катаболических процессов при ХОБЛ характеризуется также увеличением показателей ПОЛ в мокроте (табл. 3). По мере прогрессирования заболевания в индуцированной мокроте больных

повышается содержание МДА, снижается активность каталазы и супероксиддисмутазы.

Таблица 3

Содержание малонового диальдегида, активность каталазы и супероксиддисмутазы в индуцированной мокроте при ХОБЛ ($X \pm m$)

Группы	Малоновый диальдегид (мкмоль/мл)	Каталаза (мккатал/л)	Супероксиддисмутаза (Ед/мл)
Контроль, n=15	0,85±0,23	148,82±24,15	10,58±1,09
I стадия n=10	2,80±0,49 p<0,05	49,87±8,45 p<0,05	9,98±0,59 p>0,05
II стадия n=14	3,41±0,56 p<0,05	45,29±11,14 p<0,05	10,66±0,82 p>0,05
III стадия n=22	4,82±0,67 p<0,05	47,53±9,17 p<0,05	8,57±0,60 p<0,05
IV стадия n=20	4,62±0,67 p<0,05	39,16±10,18 p<0,05	8,57±0,60 p<0,05

p - достоверность различий по сравнению с контролем

Корреляционный анализ показал наличие отрицательной зависимости между МДА и α_1 -ПИ ($r=-0,3$, $p<0,05$). Снижение активности α_1 -ПИ на фоне стимуляции окислительных процессов может быть связано с повреждением метионина в активном центре ингибитора под влиянием активных форм кислорода [Веремеенко К.Н. 1994; Richardson D.E. et al., 2003].

В инактивации α_1 -ПИ также участвуют протеиназы [Nie J., Pei D., 2004; Summers F.A. et al., 2008]. В целом, низкая активность α_1 -ПИ рассматривается как неблагоприятный фактор течения ХОБЛ, поддерживающий хроническую воспалительную реакцию и необратимую обструкцию воздухоносных путей [Janciauskiene S. et al., 2004; Abboud R.T. et al., 2008].

Типовая реакция развития дефицита α_1 -ПИ при хронических заболеваниях легких проявляется также и при атопической бронхиальной астме, в патогенезе которой существенное значение имеет воспалительная реакция. У больных бронхиальной астмой снижается активность α_1 -ПИ в плазме крови на фоне повышения активности эластазоподобных протеиназ. Активность α_2 -МГ существенно не изменяется. Активность КСИ в плазме крови возрастает в 1,4 и 1,6 раз, соответственно, при легкой и средней степени тяжести заболевания. По-видимому, при заболеваниях бронхо-легочной системы увеличение активности КСИ является одним из механизмов саногенеза, направленных на ограничение повреждающего действия

протеолитических ферментов секретируемых эффекторными клетками воспаления [Taggart C.C. et al., 2005; Inoue K-I. et al., 2005].

В кожном экссудате, также как и в плазме крови больных бронхиальной астмой, снижается активность α_1 -ПИ и увеличивается активность КСИ. Активность α_2 -МГ существенно не изменяется. Воздействие аллергена в зоне «кожного окна», приводит к выраженной местной активации протеолиза, проявляющейся увеличением активности калликреина в 3,9 раз при легкой степени и в 16 раз при средней степени тяжести заболевания. В ответ на аллерген в кожном экссудате возрастает активность α_2 -МГ. Это может быть связано с синтезом α_2 -МГ иммунокомпетентными клеткам, мигрирующими в зону воздействия аллергена [Armstrong P.V., 1999; Зорин Н.А. с соавт., 2004]. Вероятно, в условиях активации протеолиза при аллергических реакциях α_2 -МГ является основным ингибитором, способным осуществлять контроль протеолитической активности.

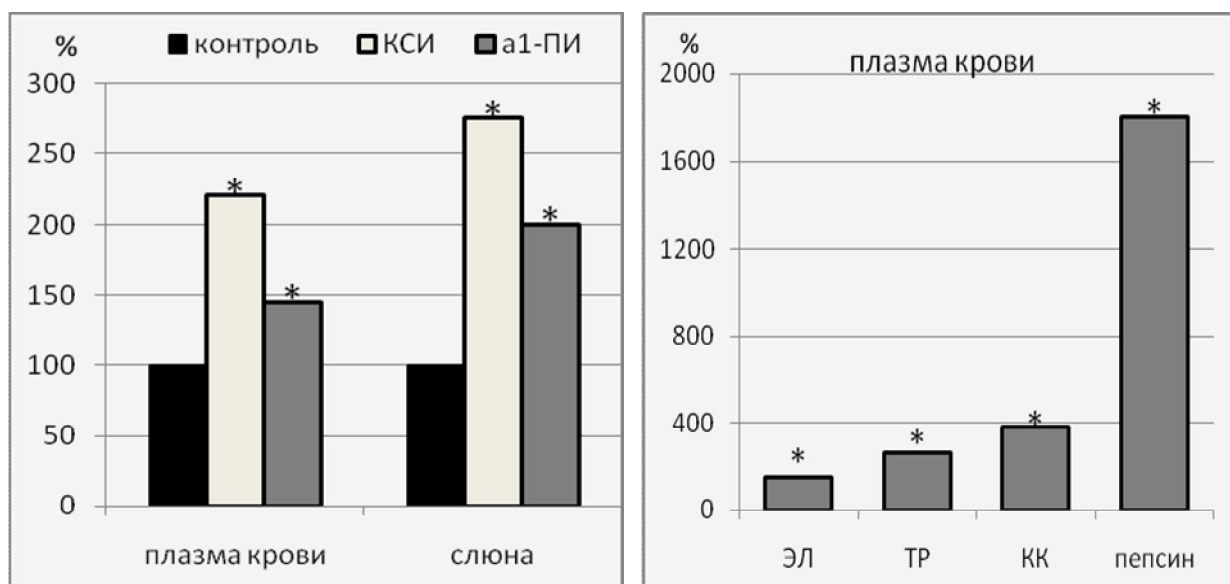
В целом при хроническом воспалении в бронхо-легочной системе проявляются два варианта реагирования ингибиторов протеиназ плазмы крови и тканей: адаптивный и дефицит. Адаптивный вариант связан с увеличением активности α_2 -МГ плазмы крови и КСИ биологических жидкостей. Дефицит ингибиторов выражается снижением активности α_1 -ПИ плазмы крови, мокроты и кожного экссудата, активности α_2 -МГ индуцированной мокроты больных и сопровождается более выраженной активацией протеолиза биологических жидкостей. При наличии аллергического компонента существенное значение в регуляции протеолиза имеет возрастание активности α_2 -МГ кожного экссудата.

Ингибиторы протеиназ при заболеваниях желудочно-кишечного тракта

Изучали активность ингибиторов, протеиназ и показатели внутриклеточного метаболизма при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, синдроме раздраженного кишечника, язвенном колите, болезни Крона и фиброзе печени.

Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки. При язвенной болезни двенадцатиперстной кишки увеличивается активность α_1 -ПИ, КСИ в плазме крови и слюне больных на фоне повышения активности эластазы, трипсина, калликреина и, особенно, пепсиноподобных протеиназ (рис. 3). Активность α_2 -МГ существенно не изменяется. При индивидуальном анализе результатов установлено, что активность α_1 -ПИ возрастает не у всех больных. Она была

повышена у 51% детей и 42% взрослых больных. Снижение активности α_1 -ПИ выявлено у 30% детей и 44% взрослых больных. Низкая активность α_1 -ПИ в плазме крови обнаружена у 45% больных астенического типа конституции, у 15 % больных с нормостеническим и 14,9% больных с гиперстеническим типом телосложения. Из истории болезни лиц с дефицитом α_1 -ПИ выявлен наследственно отягощенный анамнез по язвенной болезни и частые рецидивы заболевания в осенне-весенний период.



*- статистическая значимость отличий от контроля, $p < 0,05$

Рис. 3. Активность КСИ, α_1 -ПИ, эластазо-, трипсиноподобных протеиназ (ЭЛ, ТР), калликреина (КК) и пепсиноподобных протеиназ при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (в % к контролю)

Дефицит α_1 -ПИ может быть связан с нарушением экспрессии гена и/или посттрансляционного процессинга белка. Для α_1 -ПИ известно более 75 кодоминантных аллелей гена, продукты синтеза которых отличаются по электрофоретической подвижности. Наиболее распространен среди населения аллель М, продукты синтеза которого подразделяются на несколько субтипов, называемые фенотипами: М₁, М₂ и М₃, различающихся по антиэластазной активности [Веремеенко К.Н., 1994; Silverman G.A. et al., 2001; Пузырев В.П., 2005; Barlow I., 2008].

В группе пациентов с язвенной болезнью субтип М₁М₁ был обнаружен у 24% больных, М₁М₃ - у 33%, а М₂М₂ – у 43 % больных. Установлено, что для М₂М₂ фенотипа ингибитора характерна низкая активность α_1 -ПИ (табл. 4), увеличение активности трипсина, пепсина, выраженная активация кининогенеза по сравнению с М₁М₃ фенотипом. Вероятно, преобладание фенотипа М₂М₂ среди больных язвенной болезнью связано с

неблагоприятным течением заболевания на фоне неконтролируемой активации протеолиза.

Таблица 4

Активность ингибиторов и протеиназ в зависимости от фенотипа α_1 -ПИ

Фенотипы α_1 -ПИ	Активность α_1 -ПИ	Трипсин	Пепсин	Кининогенез	КСИ
M ₁ M ₃	↑	норма	↑	↑	↑
M ₁ M ₁	норма	норма	↑↑	↑↑	↑↑
M ₂ M ₂	↓↓	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑

↑ - увеличение активности, ↓ - снижение активности

Следует отметить, что снижение активности α_1 -ПИ сопровождается максимальным увеличением активности КСИ. Предполагается, что при язвенной болезни в условиях активации пепсиноподобных протеиназ КСИ способны контролировать протеолиз, что подтверждает положительный коэффициент корреляции $r=0,58$ между данными показателями.

Язвенный колит и болезнь Крона. Язвенный колит характеризуется деструктивными изменениями слизистой оболочки толстой кишки, а при болезни Крона поражение кишечника носит более глубокий, трансмуральный характер [Корепанов А.М. и соавт., 2001; Халиф И.Л., 2004]. В качестве группы сравнения были обследованы пациенты с синдромом раздраженного кишечника (СРК), при котором отсутствуют изъязвления кишечника. Было установлено, что при СРК происходит увеличение в 1,4 раза активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ в плазме крови на фоне активации трипсина в 2,8 раз, эластазы в 1,95 раз (табл. 5).

Увеличение ингибиторной активности плазмы крови при синдроме раздраженного кишечника носит, очевидно, защитный характер, ограничивая повреждение соединительной ткани [Веремеенко К.Н., 1994; Kotlowski R., Bernstein C.N., 2008]. При язвенном колите и, особенно, болезни Крона ингибиторная активность плазмы крови снижается. Дефицит ингибиторов сопровождается более выраженной активацией эластазоподобных протеиназ в 3,2-4,6 раза, трипсиноподобных протеиназ в 2,3-3,3 раза, увеличением свободного гидроксипролина – показателя деградации коллагена.

Снижение активности ингибиторов при язвенном колите и болезни Крона связано, вероятно, с длительной активацией протеиназ в течение более года у 2/3 исследуемых, выраженными пролонгированными обострениями с постоянными рецидивами у большинства пациентов. Длительность

заболевания при язвенном колите до 1 года выявлена у 28,3%, 2-5 лет – у 38,3%, 6-10 лет – у 15% больных, более 10 лет – у 18,4% обследованных; при болезни Крона соответственно у 21,4%, 42,8%, 14,3% и 21,5% больных.

Таблица 5

Активность ингибиторов и протеиназ в плазме крови при заболеваниях кишечника, $\bar{X} \pm m$.

Показатели	Контроль n=30	Синдром раздраженного кишечника, n=18	Язвенный колит n=31	Болезнь Крона n=42
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	26,4±0,9	35,7±1,9 p<0,05	21,0±1,3 p>0,05	15,1±0,8* p<0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	3,9±0,1	5,4±0,4 p<0,05	2,6±,1 p<0,05	1,9±0,2* p<0,05
Трипсиноподобные протеиназы, нмоль/мин·мл	65,1±4,6	183,2±18,8 p<0,05	213,8 ± 20,6 p<0,05	297,9±18,9* p<0,05
Эластазоподобные протеиназы, нмоль/мин·мл	100,1±1,9	195,8±15,6 p<0,05	231,9 ±12,9 p<0,05	326,4±33,4* p<0,05
Коллагеназоподобные протеиназы, мкмоль/час·л	7,3±0,1	8,3±0,4 p>0,05	8,3±0,2 p>0,05	8,7±0,3 p>0,05
Свободный гидроксипролин, мкг/мл	0,60±0,03	1,03±0,10 p<0,05	2,05±0,09 p<0,05	2,57±0,11* p<0,05
Пептидосвязанный гидроксипролин, мкг/мл	0,48±0,02	0,34±0,03 p<0,05	0,20±0,01 p<0,05	0,18±0,01 p<0,05
Белковосвязанный гидроксипролин, мкг/мл	6,73±0,17	5,22±0,28 p<0,05	2,69±0,11 p<0,05	1,54±0,10* p<0,05

p - достоверность отличий по сравнению с контролем,

* – значимость отличий язвенного колита и болезни Крона (p<0,05)

Дефицит ингибиторов проявляется и в ткани кишечника. Активность α_1 -ПИ в слизистой кишечника при болезни Крона была на 34% меньше, чем при СРК, и на 26% ниже, чем при язвенном колите. Активность α_2 -МГ при болезни Крона снижается на 53% по сравнению с СРК и была на 36% меньше, чем у больных язвенным колитом. Кроме того, при болезни Крона выявлена активация внутриклеточного протеолиза: активность коллагенолитических протеиназ в биоптате слизистой кишечника была выше в 1,3 раза, активность трипсиноподобных протеиназ - в 1,8 раза, относительно группы больных с язвенным колитом. Полученные данные являются биохимическим подтверждением более выраженных, затрагивающих все слои, деструктивных повреждений стенки кишечника при болезни Крона [Адлер Г., 2001, Lawrance I.C. et. al., 2001]. Предрасполагающим фактором активации протеолиза и деструкции тканей, очевидно, выступает дефицит ингибиторов в слизистой кишечника и плазме крови больных.

При деструктивных заболеваниях кишечника исследовали также окислительную модификацию белков (ОМБ) плазмы крови и слизистой кишечника (табл. 6). Показано, что в плазме крови пациентов с СРК, язвенным колитом и болезнью Крона содержание карбонильных производных возрастает, соответственно, в 1,5 раза, в 3,6 раз и 1,7 раз относительно контроля.

Таблица 6

Показатели окислительной модификация белков плазмы крови при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, $X \pm m$.

Показатели	контроль n=20	Синдром раздраженного кишечника n=18	Язвенный колит n= 60	Болезнь Крона n=42
Карбонильные производные, о.п./мл	1,5±0,1	2,2±0,6*	5,4±1,0*	2,5±0,4*
Битирозин, 10 ⁻³ у.е.	10,0±0,03	9,0±0,05	12,5±0,03*	14,0±0,02*

Примечание: о.п.- оптическая плотность, у.е. – условные единицы, *- p<0,05

Наиболее надежным маркером ОМБ принято считать повышение уровня битирозиновых сшивок, устойчивых к утилизации протеиназами [DiMarco T., Giulivi S., 2007]. Содержание битирозина не изменяется при СРК и увеличивается при деструктивных заболеваниях кишечника: в 1,3 при язвенном колите и 1,4 раза при болезни Крона. С увеличением концентрации продуктов ОМБ снижается активность α_1 -ПИ, что подтверждается отрицательными коэффициентами корреляции ингибитора с карбонильными производными и битирозином равными, соответственно, -0,7 и -0,9.

Взаимосвязь α_1 -ПИ с показателями окислительной модификации белков проявлялась и в слизистой кишечника. Снижение активности α_1 -ПИ в слизистой кишки по мере прогрессирования заболевания сопровождается возрастанием содержания карбонильных производных окислительной модификации белков. Так при тяжелой степени течения язвенного колита и болезни Крона содержание карбонильных производных было, соответственно, в 1,7 раз и в 1,6 раза выше, чем при легкой степени тяжести заболеваний (p<0,05).

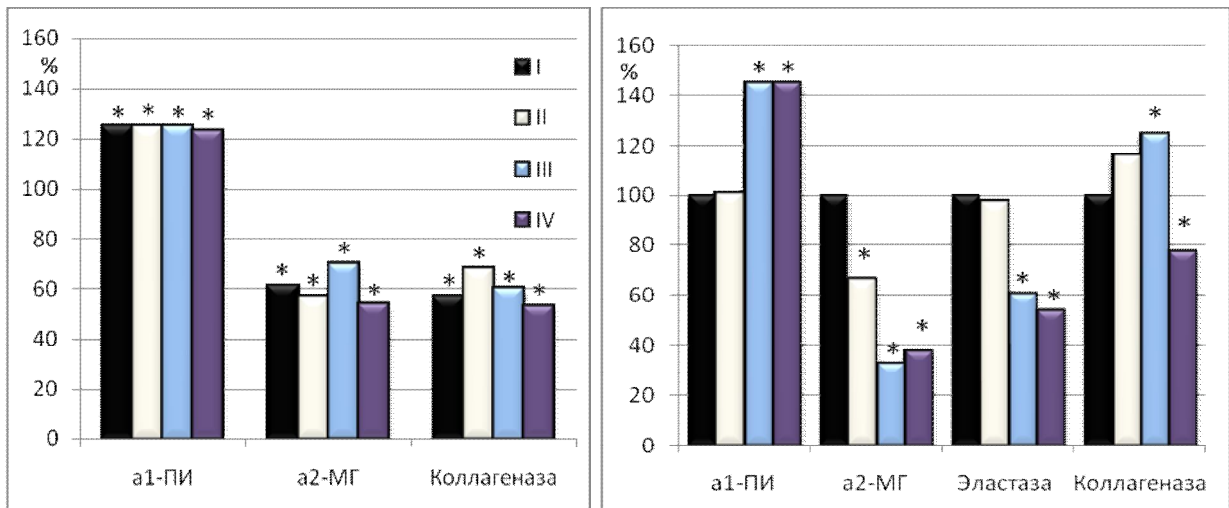
При воспалительно-язвенных заболеваниях выявлено снижение активности α_2 -МГ в плазме крови и в слизистой кишечника. При анализе полученных результатов методом логистической регрессии рассчитано, что низкая активность α_2 -МГ увеличивает риск развития болезни Крона в 3,9 раза (p=0,005).

Кроме контроля протеолиза, α_2 -МГ выполняет функции сигнальной молекулы, запуская множество путей внутриклеточной трансдукции. Связываясь с сигнальными рецепторами MGSR (alpha2-Macroglobulin signalling receptor), α_2 -МГ опосредует фосфорилирование митогенактивируемого протеина (MAP) и транскрипционного фактора CREB [Qiu Z., 2004], увеличивает содержание цАМФ, инозитолтрифосфата (PI3), кальция, активирует белки Ras и PI3-киназа-зависимые пути пролиферации клеток [Misra U.K. et al., 1993, 2002]. α_2 -МГ участвует в регуляции апоптоза посредством ингибирования каспаз [Ikari Y. et al., 2001], обладает антибактериальным, противовирусным действием [Zorin N.A., 2004]. Снижение его активности является, очевидно, неблагоприятной реакцией организма при развитии патологического процесса.

Таким образом, при деструктивных заболеваниях кишечника развивается дефицит ингибиторов протеиназ, сопровождающийся выраженной активацией плазменного и внутриклеточного протеолиза, деградацией белков соединительной ткани, окислительной модификацией белков плазмы крови и слизистой кишечника.

Фиброз печени. Активация протеолиза при хроническом воспалении рассматривается как патогенетический фактор прогрессирования фиброзного процесса [Chua F., Laurent G.J., 2006], основой которого является способность эластазы гидролизовать белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и стимулировать фиброгенез через активацию PARs, запускающих синтез транскрипционных факторов посредством реципрокных взаимодействий между TGF- β и EGFR/MEK/ERK сигнальными путями [Chua F., Laurent G. J., 2006; Кузнецова К.П., 1998; Imuro Y., Brenner D. A., 2008].

Показано, что при фиброзе печени активность эластазоподобных протеиназ плазмы крови повышается до $173,19 \pm 5,32$ нмоль/мин·мл при контроле $100,14 \pm 1,93$ нмоль/мин·мл. Активация протеолиза при фиброзе сопровождается дисбалансом ингибиторов: увеличением активности α_1 -ПИ и снижением активности α_2 -МГ. В плазме крови дисбаланс проявляется в одинаковой степени на всех стадиях фиброза (рис. 4. А). В ткани печени выраженный дисбаланс характерен для III-IV стадии (рис. 4. Б). Выявление дисбаланса ингибиторов в плазме крови, который развивается раньше, чем в ткани печени, можно использовать как дополнительный показатель хронизации заболеваний печени и развития фиброза.



А. Плазма крови (в % к контролю)

Б. Ткань печени (в % к I стадии)

Рис. 4. Активность ингибиторов и протеиназ в плазме крови (А) и ткани печени (Б) на I-IV стадиях фиброза (*- статистическая значимость).

α_2 -МГ принимает участие в защите белков соединительной ткани от деструктивного действия протеиназ, таких как коллагеназа и эластаза, связывании цитокинов, регулирующих процессы коллагенообразования, рассматривается как лимитирующий фактор чрезмерной репарации и фиброзирования тканей [Маянский Д.Н., 1994]. Снижение активности α_2 -МГ может быть обусловлено активацией протеолиза, связыванием протеиназ и выведением комплекса из кровеносного русла [Зорин Н. А. и соавт., 2004]. Низкая активность α_2 -МГ, вероятно, является существенным фактором патологического образования соединительной ткани, что подтверждает факт снижения активности α_2 -МГ в ткани печени уже с II стадии хронизации процесса (рис. 4. Б).

В патогенезе фиброза принимают участие коллагеназоподобные протеиназы, которые относятся к матриксным металлопротеиназам. Матриксные металлопротеиназы ингибируют апоптоз звездчатых клеток, вызывают их трансдифференцировку в миофибробласты, синтезирующие белки ВКМ [Okamoto K. et al., 2005; Zhu Y.K. et al., 2005]. Минимальная активность коллагеназоподобных обнаружена на IV стадии фиброза – циррозе (рис. 4. Б). Следует отметить, что в плазме крови активность коллагеназоподобных протеиназ была низкой на всех стадиях фиброза (рис. 4. А). Снижение активности коллагеназоподобных протеиназ, вероятно, приводит к торможению деградации коллагена и способствует фиброгенезу.

Дисбаланс α_1 -ПИ и α_2 -МГ при развитии фиброзе печени сопровождается увеличением активности коллагеназы в ткани печени, особенно на III стадии

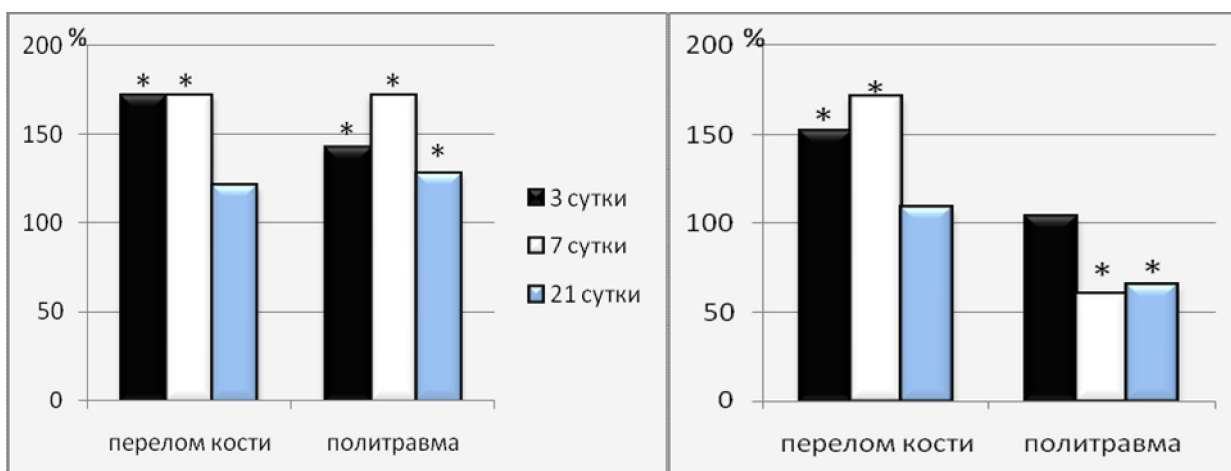
процесса. Максимальная активность коллагеназоподобных протеиназ обнаруживалась на фоне высокого содержания белковосвязанного гидроксипролина - показателя усиленной синтеза коллагена и фиброгенеза.

Таким образом, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта выявляются три варианта реагирования ингибиторов протеиназ. Адаптивный вариант проявляется при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и синдроме раздраженного кишечника. Дефицит ингибиторов выявлен в плазме крови и слизистой кишки при язвенном колите и болезни Крона. Дисбаланс ингибиторов с увеличением α_1 -ПИ и снижением α_2 -МГ характерен для фиброза печени.

Ингибиторы протеиназ при травмах кости

Умеренная активация протеиназ плазмы крови обнаружена при переломе кости: увеличение активности трипсина и калликреина в 2-2,5 раза; при множественных травмах развивается выраженная активация с повышением активности трипсина в 3 раза, калликреина в 13 раз. Активация трипсиноподобных протеиназ приводит к образованию вазоактивных кининов, нарушению микроциркуляции, развитию шока, повышению риска тромбоопасности и рассматривается как показатель интенсификации катаболических процессов в ответ на травму [Попов В.П. с соавт., 2002; Корепанов В.А. с соавт., 2000].

Активность α_2 -МГ возрастает как при умеренной, так и выраженной активации протеолиза (рис. 5. А), активность α_1 -ПИ при единичном переломе кости возрастает в 1,7 раз, а при множественных травмах снижается и сохраняется низкой до 21 суток (рис. 5. Б).



А. α_2 - МГ

Б. α_1 -ПИ

Рис.5. Активность α_2 - МГ, α_1 -ПИ плазмы крови при травмах (в % к контролю; *- значимость отличий).

Показано, что в плазме крови больных с переломами увеличивается содержание диеновых конъюгатов в 3,2-3,9 раз и малонового диальдегида в 1,5-2,0 раза. При множественной травме концентрация диеновых конъюгатов в 1,5-2,0 раза выше, по сравнению с единичными повреждениями кости.

Активация катаболизма и ПОЛ при травмах сопровождается повышением общей антиоксидантной активности, активности липазы, содержания свободных жирных кислот, холестерина и показателей резорбции кости: увеличением содержания свободного гидроксипролина, активности кислой фосфатазы и снижением активности щелочной фосфатазы – маркерного фермента остеобластов.

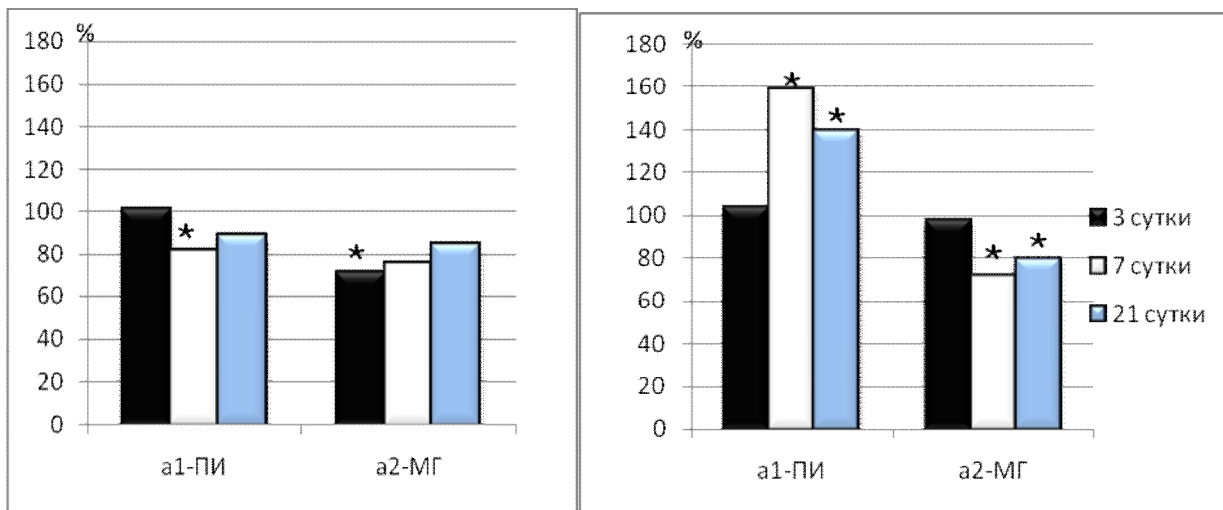
Корреляционный анализ выявил взаимосвязь между состоянием протеолиза и ПОЛ. Активность протеиназ находилась в положительной зависимости от содержания МДА и диеновых конъюгатов ($r_{xy}=0,6-0,8$). Активность α_1 -ПИ в большей степени взаимосвязана с общей антиоксидантной активностью ($r_{xy}=0,75-0,9$).

Активация протеолиза является основанием для включения в терапию таких больных поливалентного ингибитора протеолиза контрикала. Описано успешное применение контрикала для лечения и профилактики вторичной пневмонии, при тяжелых бактериальных инфекциях, бронхиальной астме, препарат благоприятно действует на течение и исход острого инфаркта миокарда [Веремеенко К.Н., 1988].

При лечении больных с травмой опорно-двигательного аппарата был использован контрикал, который вводили внутривенно в дозе 30 000 Ед на 1 сутки после перенесенной травмы в течение 3 дней. На 3 сутки, 7 и 21 сутки определяли показатели и сравнивали их с показателями больных, не получавших контрикал.

Применение контрикала в комплексном лечении травматической болезни способствует снижению активности трипсина и калликреина в плазме крови больных. Введение контрикала больным с множественными травмами повышает активность α_1 -ПИ (рис. 6. Б.). Ингибирование плазменного протеолиза под действием контрикала сопровождается изменением внутриклеточного метаболизма: снижается активность липазы, концентрация свободных жирных кислот, диеновых конъюгатов, содержание свободного

гидроксипролина - показателя резорбции кости и возрастает содержание белковосвязанного гидроксипролина – показателя остеосинтеза.



А. Перелом кости

Б. Множественные переломы

Рис. 6. Влияние контрикала на активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ при переломе кости и множественных травмах (за 100% приняты показатели больных, не получавших контрикал; * - статистическая значимость).

Таким образом, изменения метаболизма при травмах опорно-двигательного аппарата определяются степенью резорбции кости и общей реакцией организма, выражающейся в активации протеолиза. В этом плане особое значение имеет выявление больных с низкой активностью ингибиторов протеолитических ферментов, которые являются группой риска развития осложнений и требуют назначения специфической фармакологической коррекции биохимических нарушений.

Ингибиторы протеиназ при онкологических заболеваниях

Хроническое воспаление является одним из промоторных факторов формирования опухоли. Известно, что ХОБЛ увеличивает риск развития опухоли легких в 4-5 раз, а в сочетании с курением - в 7 раз. Наследственный дефицит α_1 -ПИ увеличивает риск развития опухоли в 2 раза. В структуре онкологических заболеваний второе место после рака легкого занимает рак желудка [Parkin D.M., 2006; Чиссов В.И., 2007; MacKinnon A.C. et al., 2010].

Определяли активность ингибиторов протеиназ в плазме крови больных с раком легких и у пациентов с аденокардиномой желудка III стадии, находящихся на лечении в НИИ онкологии СО РАМН. При этих опухолях увеличивается активность α_1 -ПИ плазмы крови и снижается α_2 -МГ на фоне увеличения калликреина в 1,9 раза. Для оценки дисбаланса ингибиторов при онкологических заболеваниях рассчитывали отношение активности α_1 -ПИ к

активности α_2 -МГ (α_1 -ПИ/ α_2 -МГ). Коэффициент возрастает в 2,0 раза при раке легкого и в 2,2 раза при раке желудка.

Повышение активности α_1 -ПИ в крови больных с новообразованиями, вероятно, обусловлено естественной реакцией на активацию протеолиза и рассматривается как защитный механизм от инвазии опухоли, в процессе которой принимают участие протеиназы. Механизм его увеличения связывают как с активацией протеолиза плазмы крови, так и с деструкцией опухоли, клетки которой, как предполагают, секретируют ингибитор трипсина [Wesermann F.H., 1990].

Снижение α_2 -МГ, очевидно, является неблагоприятным фактором течения онкологического заболевания, т.к. известно, что α_2 -МГ обладает цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам [Коо Р.К., 1983; Lindner I. et al., 2010]. Непосредственное противоопухолевое действие α_2 -МГ заключается в ингибировании пролиферации трансформированных клеточных линий, а косвенное действие осуществляется через иммунную систему [Мишин Ю.В., 1988; Веремеенко К.Н., 1994].

Дисбаланс ингибиторов проявляется также при опухолях кости. Опухоли костно-суставной локализации составляют около 1% от общего числа онкологических заболеваний, из них на долю гигантоклеточной опухоли кости (ГКОК) приходится 8,6%, а хондросаркомы - 12%. По сравнению с ГКОК, хондросаркома имеет злокачественный, часто рецидивирующий характер [Ланцман Ю.В., 1990]. Коэффициент отношения α_1 -ПИ/ α_2 -МГ плазмы крови при ГКОК возрастает в 2,2 раза, а при хондросаркоме в 2,7 раза по сравнению с практически здоровыми лицами.

Увеличение коэффициента α_1 -ПИ/ α_2 -МГ плазмы крови при опухолях кости сопровождается резорбцией кости, что подтверждает повышение в плазме крови содержания кальция в 1,5-1,7 раза, активности кислой фосфатазы в 4 раза, фракций гидроксипролина: свободного в 1,9-2,5 раза, пептидосвязанного в 2,3-2,4 раза и белковосвязанного в 1,3-1,7 раза, относительно контроля.

В опухолевой ткани хондросаркомы выявлено, что активность щелочной фосфатазы – маркерного фермента остеобластов – на 68% меньше по сравнению с ГКОК (табл. 7). В то же время активность коллагеназоподобных протеиназ в ткани хондросаркомы была в 1,6 раз выше, чем в ГКОК. Очевидно, что рост этой опухоли в большей степени сопровождается

резорбцией кости по сравнению с ГКОК. В ткани хондросаркомы, по сравнению с ГКОК, снижена активность α_1 -ПИ. Снижение защитного действия ингибиторов в ткани опухоли на фоне активации протеолиза может выступать как фактор, благоприятствующий инвазии опухолевых клеток в здоровую ткань [Elliot P.R. et al., 1998; Zelvyte I., 2003; Kloth J.N. et al., 2008].

Таблица 7

Активность ингибиторов и ферментов в опухолевой ткани ($X \pm m$)

Показатели	Гигантоклеточная опухоль кости, n=10	Хондросаркома n=6
Щелочная фосфатаза, Е/мг белка	583,5 \pm 22,2	189,2 \pm 17,2 p<0,05
Коллагеназоподобные протеиназы, мкмоль/ч мг белка	6,7 \pm 0,9	10,8 \pm 1,5 p<0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, мИЕ/мг белка	14,7 \pm 3,6	0,2 \pm 0,05 p<0,05

p - достоверность отличий между опухолями

Универсальность дисбаланса ингибиторов при развитии опухоли в организме подтверждают результаты изучения протеолиза в условиях экспериментального опухолевого роста. Коэффициент α_1 -ПИ/ α_2 -МГ плазмы крови мышей линии BALB/c, которым внутрибрюшинно были введены клетки мастоцитомы Р-815, возрастает и на 14 сутки роста опухоли превышает контрольные показатели в 3 раза.

Увеличение коэффициента α_1 -ПИ/ α_2 -МГ плазмы крови сопровождается активацией внутриклеточного протеолиза: активность катепсина D в асцитной опухоли возрастает с 9,8 \pm 1,8 нмоль тир/мин·мг до 18,4 \pm 4,9 нмоль тир/мин·мг. Введение контрикала мышам-опухоленосителям приводит к снижению активности катепсина D опухолевых клеток до 11,9 \pm 0,6 нмольтир/мин·мг и уменьшению количества клеток мастоцитомы Р-815 с 41,0 \pm 5,8 млн/мл до 23,3 \pm 2,7 млн/мл. Показано, что введение контрикала мышам-опухоленосителям препятствует дисбалансу: увеличивает активность α_2 -МГ и снижает активность α_1 -ПИ. Коэффициент α_1 -ПИ/ α_2 -МГ понижается до уровня контроля.

При культивировании клеток мастоцитомы Р-815 в условиях *in vitro* активность α_2 -МГ также повышается (табл. 8). Увеличение активности α_2 -МГ происходит на пике пролиферативной активности клеток, через 24 часа от начала культивирования, что подтверждено повышением включения H^3 -

тимидина до 53300 ± 100 имп/мин по сравнению с исходными значениями 13900 ± 140 имп/мин.

Таблица 8

Активность α_1 -ПИ, α_2 -МГ и протеиназ в процессе роста культуры клеток мастоцитомы P-815 *in vitro*

Показатели	Время культивирования			
	2 часа	6 часов	24 часа	72 часа
α_1 -ПИ, ИЕ/мл	$1,06 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,02^*$	$0,94 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,04$
α_2 -МГ, 10^{-1} ИЕ/мл	$0,41 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,13$	$1,35 \pm 0,09^*$	$1,53 \pm 0,08^*$
Катепсин D, нмоль/мин·мл	$1,31 \pm 0,12$	$22,31 \pm 0,34^*$	$1,41 \pm 0,25$	$0,97 \pm 0,08$
Эластаза, нмоль /мин·мл	$0,11 \pm 0,02$	$5,22 \pm 0,19^*$	$0,11 \pm 0,04$	$6,23 \pm 0,15^*$
Трипсин, мЕ/мл	$0,31 \pm 0,09$	$1,18 \pm 0,12^*$	$0,91 \pm 0,06^*$	$3,46 \pm 0,14^*$

*- статистическая значимость отличий по сравнению с 2 часами, $p < 0,05$

Высокая активность α_2 -МГ сохраняется до 72 часов культивирования и сопровождается увеличением активности эластазо- и трипсиноподобных протеиназ. Повышение активности α_2 -МГ по мере роста клеток мастоцитомы P-815 согласуется с данными литературы о способности опухолевых клеток синтезировать этот ингибитор как средство защиты от апоптоза [Зорин Н.А., 2006; Montel V. et al., 2007; Elliot P.R., 2007].

Таким образом, особенностью реакции ингибиторов при онкологических заболеваниях является снижение активности α_2 -МГ плазмы крови на фоне увеличения активности α_1 -ПИ, коллагеназо-, эластазо- и трипсиноподобных протеиназ. Дисбаланс ингибиторов протеиназ с увеличением отношения α_1 -ПИ/ α_2 -МГ наиболее выражен при злокачественном характере роста опухоли. Противоопухолевое действие контрикала сопровождается снижением активности протеиназ и увеличением активности α_2 -МГ.

Математические классификационные модели

Для оценки наиболее информативных показателей при изучаемых патологиях и их вклада в математическую классификационную модель был использован пошаговый дискриминантный анализ. Для построения дискриминантных функций были использованы 9 показателей: α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ, трипсино-, эластазо-, коллагеназоподобные протеиназы, свободный, пептидно- и белковосвязанный гидроксипролин. Рассчитаны

канонические линейные классификационные функции (КЛКФ) для изучаемых патологий в сравнении с контрольной группой.

Информативными показателями для синдрома раздраженного кишечника и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки являются активность α_2 -МГ, содержание свободного и белковосвязанного гидроксипролина: $\text{КЛКФ}_1 = 3,46 - 0,31 \cdot \alpha_2\text{-МГ} - 0,54 \cdot \text{СО} - 0,06 \cdot \text{БСО}$. Для деструктивных заболеваний кишечника значимыми показателями оказались фракции гидроксипролина: $\text{КЛКФ}_2 = -1,95 - 0,3 \cdot \text{СО} + 1,12 \cdot \text{ПСО} + 0,81 \cdot \text{БСО}$.

α_1 -ПИ вошел в число информативных показателей в КЛКФ при фиброзе печени и был взаимосвязан с активностью эластазо-, коллагеназоподобных протеиназ и пептидносвязанным гидроксипролином: $\text{КЛКФ}_3 = -1,59 + 0,028 \cdot \alpha_1\text{-ПИ} + 0,006 \cdot \text{Эл} - 0,43 \cdot \text{кол} + 0,84 \cdot \text{ПСО}$.

При онкологических заболеваниях наряду с α_1 -ПИ информативным показателем была активность трипсиноподобных протеиназ: $\text{КЛКФ}_4 = 0,79 + 0,05 \cdot \alpha_1\text{-ПИ} - 0,04 \cdot \text{Тр}$.

Математическая модель, полученная дискриминантным анализом, позволяет диагностировать у пациента заболевание, для которого рассчитанное значение КЛКФ максимально приближено к соответствующему центроиду. Центроиды кластеров для моделей с КЛКФ_1 , КЛКФ_2 , КЛКФ_3 , КЛКФ_4 , соответственно, равны -0,58; -1,12; 1,19 и 2,62. Качество распознавания данных патологий посредством сопоставления предсказанной и наблюдаемой классификации в обучающей матрице составило для КЛКФ_1 88%, для КЛКФ_2 - 92 %, а для КЛКФ_{3-4} - 97%.

Дискриминантный анализ не позволил выявить решающих правил диагностики ХОБЛ и бронхиальной астмы, вероятно в связи с однотипностью изменений исследуемых показателей. Однако методом логистической регрессии показано, что по активности α_2 -МГ можно предсказать наличие патологии в области бронхо-легочной системы. В данной модели, чем больше активность α_2 -МГ, тем меньше вероятность обнаружить ХОБЛ.

Дополнительно, методом логистической регрессии выявлено, что высокие показатели α_1 -ПИ на фоне низкой активности α_2 -МГ увеличивают вероятность обнаружить опухоль или фиброз. Установлено, что снижение активности α_2 -МГ увеличивает риск развития опухоли легких и желудка в 1,6 раз, а фиброза печени - в 1,7 раз.

Анализ полученных результатов позволяет выделить три типа реагирования ингибиторов протеолиза плазмы крови при патологических процессах: адаптивный, дефицит и дисбаланс ингибиторов (рис. 8).

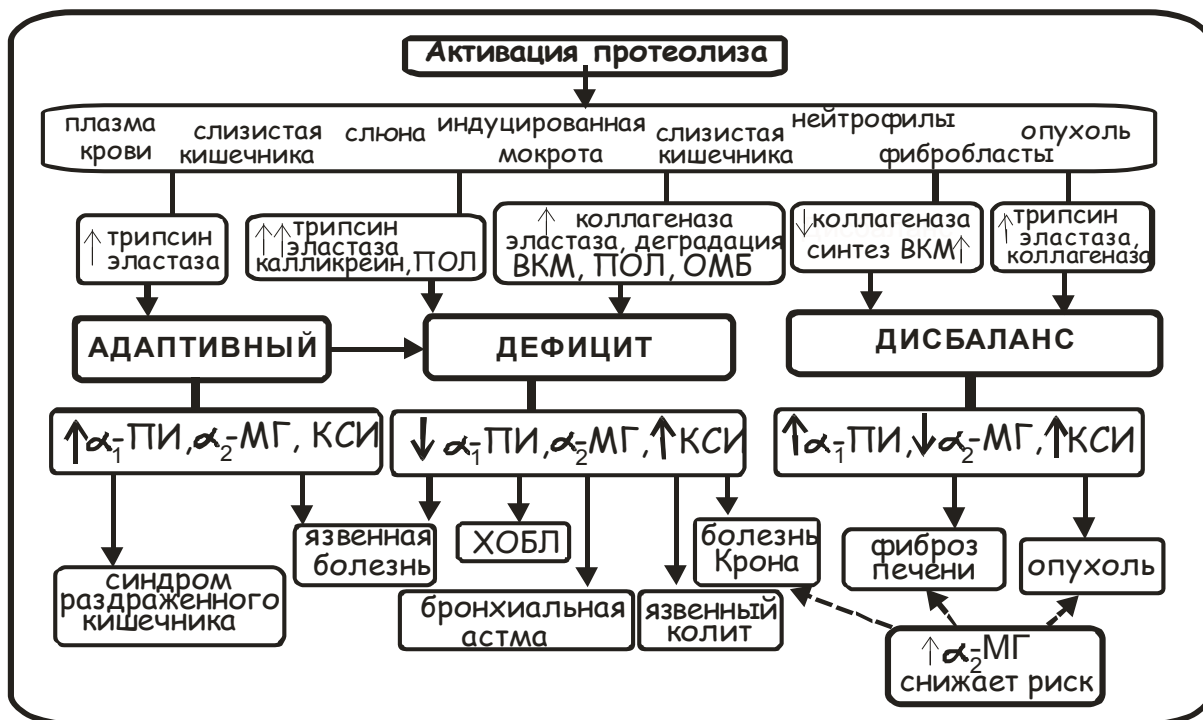


Рис 8. Варианты реагирования ингибиторов протеиназ

Адаптивный вариант реагирования, с увеличением активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ, связан с умеренной активацией протеолиза, перекисного окисления липидов, незначительным повреждением соединительной ткани. При дефиците ингибиторов сдвиг метаболизма в сторону катаболических реакций сопровождается выраженной активацией протеолиза, деградацией внеклеточного матрикса, активацией перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков.

Снижение активности ингибиторов можно рассматривать не только как следствие хронической активации эластазо- и коллагеназоподобных протеиназ, но и как возможную причину нарушения контроля внутриклеточного протеолиза, в частности, слизистой кишечника, повышенной деградации соединительной ткани, развития язвенного колита и болезни Крона.

Определяющим фактором при фиброзе печени является снижение активности α_2 -МГ как в плазме крови, так и в ткани печени. Дисбаланс ингибиторов наблюдается также при онкологических заболеваниях. Снижение активности α_2 -МГ в этом случае способствует поддержанию

высокого пролиферативного потенциала неопластически трансформированных клеток. Низкая активность α_2 -МГ повышает риск развития фиброза печени.

Результаты проведенного исследования являются основанием для использования α_1 -ПИ, α_2 -МГ и КСИ в качестве показателей в клинико-лабораторной диагностике хронических обструктивных заболеваний легких, деструктивных болезней кишечника и оценке прогрессирования фиброза печени. Выявление больных с низкой активностью α_1 -ПИ и особенно, α_2 -МГ, необходимо для разработки патогенетически обоснованного лечения, мониторинга течения хронических заболеваний и прогноза развития осложнений.

ВЫВОДЫ

1. Контроль над активностью протеолиза в организме практически здоровых лиц осуществляют ингибиторы протеиназ, локализованные в основном в плазме крови. В слюне, индуцированной мокроте активность α_1 -ПИ, α_2 -МГ значительно ниже и составляет от 0,4% до 11% от показателей плазмы крови. Наиболее высокая активность КСИ обнаружена в кожном экссудате и плазме крови, затем слюне и индуцированной мокроте. Активность α_1 -ПИ и КСИ плазмы крови коррелирует с показателями в слюне и кожном экссудате, активность α_2 -МГ плазмы крови не зависит от ингибиторных свойств других биологических жидкостей.
2. Согласованное действие ингибиторов протеолиза наблюдается у практически здоровых лиц при локальной гипоксии, курении, воздействии экологических факторов риска развития заболеваний. Увеличение активности α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ сопровождается изменением клеточного метаболизма: активности аминотрансфераз, 5'-нуклеотидазы, α -амилазы, показателей перекисного окисления липидов.
3. При патологических процессах выявлены три варианта реагирования ингибиторов: адаптивный, дефицит и дисбаланс. При адаптивном варианте повышается активность α_1 -ПИ, α_2 -МГ, КСИ на фоне умеренной активации протеолиза. Дефицитный вариант со снижением активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ протекает на фоне выраженной активации протеолиза, окислительной модификации белков и липидов, разрушения белков соединительной ткани. Дисбаланс ингибиторной активности связан со снижением активности α_2 -МГ и увеличением α_1 -ПИ.

4. Дефицит α_1 -ПИ и α_2 -МГ при заболеваниях бронхо-легочной системы обнаружен в индуцированной мокроте и является показателем прогрессированием заболевания. Низкая активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ сопровождается высокой активностью КСИ в плазме, индуцированной мокроте и кожном экссудате больных.
5. Снижение активности α_1 -ПИ наиболее выражено при наличии M_2M_2 фенотипа и астенического типа телосложения больных. Дефицит α_1 -ПИ и α_2 -МГ при активации внутриклеточного протеолиза слизистой кишечника сопровождается усилением окислительной модификации белков, перекисного окисления липидов, деградацией коллагена соединительной ткани желудочно-кишечного тракта. Увеличение активности α_2 -МГ снижает риск развития болезни Крона и фиброза печени в 3,8 и 1,7 раза, соответственно.
6. Активация протеолиза плазмы крови при травмах кости сопровождается увеличением активности α_2 -МГ и уменьшением α_1 -ПИ на фоне усиленной резорбции кости, липолиза и перекисного окисления липидов. Контрикал снижает активность калликрейна и трипсина плазмы крови, предупреждает развитие дефицита α_1 -ПИ, приводит к снижению содержания диеновых конъюгатов, свободных жирных кислот, активности липазы и стимулирует остеосинтез.
7. Дисбаланс ингибиторов характеризуется повышением коэффициента α_1 -ПИ/ α_2 -МГ при фиброгенезе. Увеличение коэффициента α_1 -ПИ/ α_2 -МГ в 2,2-2,7 раз наблюдается при раке легкого, желудка, кости. Снижение активности α_2 -МГ увеличивает риск развития онкологических заболеваний. Низкая ингибиторная активность в опухоли сопровождается выраженной протеолитической деградацией ткани.
8. Противоопухолевое действие контрикала сопровождается увеличением активности α_2 -МГ плазмы крови мышей-опухоленосителей с мастоцитомой Р-815. Повышение активности α_2 -МГ в условиях *in vitro* протекает на фоне возрастания активности катепсина D, эластазо- и трипсиноподобных протеиназ опухолевых клеток.

Список публикаций по теме диссертации

1. Оценка состояния системы протеолиза в диагностике заболеваний / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, Е.В. Дюкова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997.- № 6. - С. 21 – 22.
2. Суханова, Г.А. Ингибиторы протеолиза как показатели обратимости патологических процессов / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева, Е.В. Дюкова // Материалы 3 съезда физиологов Сибири и Дальнего Востока, - Новосибирск. – Изд-во типографии СО РАМН, 1997. – С. 224 – 225.
3. Биохимические нарушения при радиационно-химических воздействиях факторов внешней среды / О.Е. Акбашева, С.В. Рыжов, А.Э. Сазонов, Е.В. Дюкова // Тезисы докладов I Международного научного семинара в рамках международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука – третье тысячелетие». Томск, ТГУ. - 1997. – С.100.
4. Акбашева, О.Е. Биохимическая диагностика резорбции кости при опухолях костно-суставной системы / О.Е. Акбашева, И.А. Щепеткин, А.А. Жеравин // Международная конференция молодых ученых России с международным участием. «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины посвященной 140-летию ММА им. И.М. Сеченова. М. , 1998. – С. 42.
5. Суханова, Г.А. Показатели протеолиза в оценки эффективности лечения язвенной болезни / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева, Е.В. Пехтерева // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – № 8 – С. 49.
6. Суханова, Г.А. Биохимические показатели состояния здоровья населения северных районов Томской области / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева, Е.В. Дюкова // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Медицина и экологические проблемы Северных районов Сибири» - Стрежевой, 28-29 мая, 1998 – С. 178-179.
7. Акбашева, О.Е. Маркеры резорбтивного и остеобластного типов при опухолях костно-суставной системы / О.Е. Акбашева, Е.В. Буэль, Г.А. Суханова // Клиническая лабораторная диагностика. - 1999. - № 9. - С. 15.
8. Акбашева, О.Е. Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в плазме крови мышей при опухолевом росте / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова // **Бюллетень эксперим. биологии и медицины** . - 1999. - Т. 128, №7. - С. 69 - 72.
9. Сравнительная биохимическая и морфологическая характеристика хондросаркомы и гигантоклеточной опухоли кости / О.Е. Акбашева, И.А. Щепеткин, Г.А. Суханова, Н.В. Васильев и др. // **Вопросы онкологии**. - 2000. - Т. 46 № 3. - С. 298 - 300.
10. Показатели протеолиза в оценке резорбции при опухолях кости / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, И.А. Щепеткин и др. // Клиническая лабораторная

диагностика. – 2000. – № 11. – С. 22 - 33.

11. Акбашева, О.Е. Фенотипы α_1 -протеиназного ингибитора и активность протеолитических ферментов плазмы крови при язвенной болезни / О.Е. Акбашева, Е.В. Пехтерева, Т.М. Скороходова // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.** - 2001.- № 2. - С. 44 - 46.

12. Антиоксиданты и ингибиторы протеолиза в оценке состояния здоровья человека / Г.А. Суханова, О.Е, Акбашева, Е.В. Дюкова, А.П. Кондратьев // **Клиническая лабораторная диагностика.** - 2001. - № 11. - С. 8.

13. Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в пролиферации мастоцитомы P-815 in vitro / О.Е. Акбашева, Ю.П. Бельский, Н.В. Бельская, Т.И. Панова // **Вопросы онкологии.** - 2001. - Т. 47, № 5.- С. 619 - 622.

14. Активность пепсиноподобных протеиназ и ингибиторов протеолиза при язвенной болезни детей / О.Е. Акбашева, Г.А.Суханова, Е.В. Пехтерева, Л.П. Бушмелева // **Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии.** - 2002.-С.56-58.

15. Активность эластазы и ее ингибиторов при разной этиологии обострения у больных хроническим обструктивным бронхитом / Е.Б. Букреева, О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова и др. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** - 2002. - приложение 1. - С. 55 - 57.

16. Роль ингибиторов протеолиза при заболеваниях бронхо-легочной системы / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, Е.Б. Букреева, Е.А. Дементьева // **Материалы 4 съезда физиологов Сибири «Физиология организма в нормальном и экстремальном состоянии».** - Томск, 2002. - С. 8 - 9.

17. Влияние контрикала на перекисное окисление липидов у пострадавших с травмой опорно-двигательного аппарата / В.П. Попов, О.Е. Акбашева, А.А. Кашеварова // **Материалы Всероссийской научно-практической конференции.**- Новосибирск: Издатель, 2002. - С. 127 - 128.

18. Характеристика клеточного и биохимического профиля индуцированной мокроты и крови у курящих и некурящих здоровых людей / Л.И.Волкова, Е.Б. Букреева, В.В. Боярко, Н.Г. Польща, Е.А. Дементьева, О.Е. Акбашева // **Пульмонология.** - 2004. - № 2. - С. 78 - 83.

19. Применение эреспала у больных хронической обструктивной болезнью легких / Е.Б. Букреева, С.В. Нестерович, Е.А. Дементьева, Р.И. Плешко, О.Е. Акбашева и др. // **Пульмонология.** - 2004. - № 2. - С. 102 – 108.

20. Дисперсионный и корреляционный анализ показателей обмена коллагена и конституциональных типов больных при язвенной болезни / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, Т.А. Загрямова и др. // **Клиническая лабораторная диагностика.** - 2004. - № 9. - С. 69.

21. Акбашева, О.Е. Биохимические показатели обмена коллагена при язвенной

болезни в зависимости от конституциональных типов больных / О.Е.Акбашева, Т.А. Загимова, С.Ю. Ермаков // Сборник научных трудов, посвященных 70-летию кафедры биохимии ГОУ ВПО ИГМА / под ред. Е.Г. Бутолина, П.Н. Шараева, С.Е. Переведенцевой. - Ижевск, 2005. - С. 53 - 56.

22. Акбашева, О.Е. Активность ингибиторов протеиназ плазмы крови в зависимости от типа конституции в норме и при патологии / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, Т.А. Загимова // Бюллетень Сибирской медицины - 2005.- Т.4, приложение 1. - Тезисы V Сибирского физиологического съезда - С. 4.

23. Изменение состояние хроматина и формирование проканцерогенного микроокружения при хронической обструктивной болезни легких в сочетании с курением / Б.В. Шилов, Е.Б. Букреева, О.Е. Акбашева, Н.Н. Ильинских // Материалы международного симпозиума «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки». – Тюмень, 2005. – С. 100 – 101.

24. Диагностическая ценность биохимических маркеров фиброза в оценке хронизации гепатита / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, Р.Ф. Абдрашитов, О.Е. Акбашева и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. Приложение № 28. Материалы 12-й Российской гастроэнтерологической недели. – Москва, октябрь, 2006. – Т. XVI. – № 5. – С. 74.

25. Коллагенолитическая активность крови у больных хроническим вирусным гепатитом / Э. И. Белобородова Р. Ф. Абдрашитов, Е. В. Белобородова, Пурлик И.Л. / 8-й Международный Славяно-Балтийский научный форум «Санкт-Петербург-Гастро-2006». – Санкт-Петербург, май, 2006. – С. 20.

26. Эффективность терапии обострений хронической обструктивной болезни легких и биомаркеры воспаления / Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печеркина, О.Е. Акбашева и др. // **Уральский медицинский журнал.** - № 8. – 2007. - С. 8-10.

27. Активность воспалительного процесса в фазу стабильного течения ХОБЛ / Е.Б. Букреева, С.В. Нестерович, О.Е. Акбашева и др. // Материалы III конгресса Евроазиатского респираторного общества, Астана, 2007.- С. 159.

28. Акбашева, О.Е. Показатели протеолиза и фенотипы α_1 -протеиназного ингибитора при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / О.Е. Акбашева, В.Ю. Серебров // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** - 2007. - № 2. - С. 41 – 44.

29. Акбашева, О.Е. Показатели протеолиза плазмы крови и фенотипы α_1 -протеиназного ингибитора при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей / О.Е Акбашева // **Биомедицинская химия.** - 2007. -Том 3, № 3. - С. 338-344.

30. Загимова, Т.А. Активность ингибиторов протеиназ плазмы крови при язвенной болезни в зависимости от морфофенотипа конституции больных / Т.А.

- Загромова, О.Е. Акбашева, С.Ю. Ермаков // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.** - 2007. - № 4 - С. 30 - 35.
31. Диагностическая ценность определения сывороточных маркеров фиброза печени при хроническом вирусном гепатите / Э.И. Белобородова, Р.Ф. Абдрашитов, Е.В. Белобородова, В.А. Бурковская, О.Е. Акбашева и др. // **Клиническая медицина.** - 2007. - Том. 85, № 9. - С. 61 – 63.
32. Акбашева, О.Е. Диагностическое значение ингибиторов протеиназ при заболеваниях бронхо-легочной системы / О.Е. Акбашева // **Клиническая лабораторная диагностика.** - 2007. - № 9. - С. 83.
33. Акбашева, О.Е. Система протеиназы-ингибиторы и содержание гидроксипролина в плазме крови и ткани печени при фиброзе / О.Е. Акбашева, Е.В. Белобородова, Н.П. Чежина // **Вятский медицинский вестник.** -2007.- № 4.- С.34-35.
34. Активность системы «протеиназы-ингибиторы» и перекисное окисление липидов индуцированной мокроты при хронической обструктивной болезни легких / О.Е. Акбашева, Е.Г. Учасова, Т.С. Овчинникова, Г.Э. Черногорюк // **Вятский медицинский вестник.** - 2007. - № 4.- С. 33.
35. Активность протеиназ, ингибиторов и перекисное окисление липидов в сыворотке крови и биоптате кишечника при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / О.Е. Акбашева, А.Е. Деханд, Е.А. Преймачук, В.А. Бурковская // **Вятский медицинский вестник.** - 2007. - № 4. - С. 33 – 34.
36. Anti-inflammatory activity of Erespal (Fenspirid, Servie, France) at COPD / E. Bukreeva, S. Nesterovich, O. Akbasheva et al. // Abstract 17th ERS Annual Congress, September, 15-19, 2007. - P. 75s
37. Etiology of inflectional process and inflammation peculiarities at COPD / E. Bukreeva, S. Nesterovich, L. Gudkova, O. Akbasheva et al. // Abstract 17th ERS Annual Congress, September, 15-19, 2007. - P. 404s.
38. Ингибиторы протеиназ в регуляции пролиферативного ответа опухолевых клеток / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, Ю.П. Бельский и др. // **Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов Новосибирск: Изд-во «Арта», 2008. - С. 177.**
39. Метаболизм коллагена при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / А.Е. Деханд, О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова и др. // **Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск: Изд-во «Арта», 2008. - С. 422.**
40. Функциональные свойства клеточного и гуморального звеньев иммунной системы при хронических заболеваниях печени / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, Н.В. Рязанцева, Г.Э. Черногорюк, М.И. Рачковский, И.Л. Пурлик, О.Е. Акбашева и др. // **Вестник Санкт-Петербургской государственной**

медицинской академии им. И.И. Мечникова. - 2008. - № 3. - С. 79 - 84.

41. Диагностическое значение ингибиторов протеиназ плазмы крови при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, В.А. Бурковская, Э.И. Белобородова // Материалы научно-практической конференции «Медико-биологические науки для теоретической и клинической медицины». Москва, 2008. - С. 22.

42. Акбашева, О.Е. Оксидативный стресс и протеолиз при язвенных заболеваниях желудочно-кишечного тракта / О.Е. Акбашева, В.А. Бурковская, Э.И. Белобородова // Материалы конференции «Медико-биологические науки для теоретической и клинической медицины». - Москва, 2008. - С. 21.

43. Загროмова, Т. А. Активность системы протеолиза плазмы крови при язвенной болезни в зависимости от морфофенотипа конституции больных / Т.А. Загროмова, О.Е. Акбашева, Э.И. Белобородова // Сибирский вестник гепатологии и гастроэнтерологии. - 2008. - № 22. - С. 31-33.

44. Влияние регуляторов энергетического обмена на клиническое течение и биомаркеры воспаления при лечении обострений тяжелой хронической обструктивной болезни легких / М.С. Санжаровская, Н.В. Варвянская, Н.С. Ямкина, И.Н. Печёркина, А.А. Смотровая, С.И. Антипов, Е.П. Рослякова, О.Е. Акбашева и др. // **Бюллетень Сибирской медицины**. - 2008. - Т. 7, № 3. - С. 109 -115.

45. Characterization of cellular and biochemical profiles of induced sputum from the herd-core smokers, not suffering from COPD / E. Bukreeva, S. Nesterovich, G. Sietova, O. Akbasheva // European respiratory Journal. Abstract 19th ERS Annual Congress - 2009. - V. 34. Supp 53. - P.503s.

46. Морфологические и биохимические маркеры воспалительных реакций в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Р.И. Плешко, Л.М. Огородова, О.Е. Акбашева и др. // **Бюллетень Сибирской медицины**. - 2009. - Том. 8, № 3. - С. 11 - 16.

47. Диагностическая чувствительность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, В.А. Бурковская и др. // Материалы Российской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» - Челябинск, 5-8 октября, 2009. - С. 173 - 175

48. Диагностическое значение показателей протеолиза и оксидативного стресса при заболеваниях кишечника / О.Е. Акбашева, Г.А. Суханова, Е.В. Дюкова и др. // Научные труды X международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке», «Инновационные технологии в биологии и медицине», Москва, РУДН, 9-12

декабря, 2009. - С. 1021 – 1022.

49. Роль клеточных и молекулярных мишеней в формировании различных паттернов воспаления при гетерогенных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы / Е.А. Геренг, И.В. Суходоло, Л.М. Огородова, Р.И. Плешко, О.Е. Акбашева и др. // **Пульмонология**. - 2009. - № 5 . - С. 78 - 82.

50. Механизмы прогрессирования фиброза печени при хроническом течении заболеваний вирусной и токсической этиологии / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, О.Е. Акбашева и др. // **Медицинский вестник Северного Кавказа**. - 2009. - № 2. - С. 19 -25.

51. Показатели обмена коллагена и эластина при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / О.Е. Акбашева, В.А. Бурковская, Э.И. Белобородова и др. // **Сибирский вестник гепатологии и гастроэнтерологии**. - 2009. - № 23. - С. 27-31.

52. Активность эластазо-, коллагеназоподобных протеиназ и их ингибиторов в плазме крови при метаболизме коллагена в условиях хронического течения заболеваний печени вирусной и токсической этиологии / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, О.Е. Акбашева и др. // **Бюллетень СО РАМН**. - 2010. - Т.30, № 2. - С. 94 – 100.

53. Активация антипротеиназ в бронхиальном регионе – фактор толерантности формирования хронической обструктивной болезни легких у здоровых злостных курильщиков / Г.Э. Черногорюк, А.А. Михайлова, С.В. Федосенко, О.Е. Акбашева и др. // **Бюллетень СО РАМН**. - 2010. - Т. 30, № 3. - С. 124 – 129.

54. Активность трипсиноподобных протеиназ и деградация коллагена слизистой оболочки кишечника при язвенных заболеваниях желудочно-кишечного тракта / О.Е. Акбашева, В.А. Бурковская, А.Е. Деханд и др. // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии**. - 2010. - Т. XX. - № 2. - С. 31-38.

55. Протеолитическая деградация соединительной ткани при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / В.А. Бурковская, О.Е. Акбашева, А.В. Сморгон // **Сибирский медицинский журнал**. - 2010. - Т. 25, № 1. - С. 62 – 66.

56. Показатели системы протеолиза и метаболизма коллагена при хроническом течении заболеваний печени вирусной и токсической этиологии / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, О.Е. Акбашева и др. // **Терапевтический архив**. - 2010, № 2. - С. 29 - 34.

57. Поражение печени при хроническом вирусном гепатите С на фоне опиоидной наркомании: морфологические аспекты / Е.В. Белобородова, Д.В. Подгорнова, И.Л. Пурлик, Э.И. Белобородова, Л.А. Петров, М.М. Волчановская, С.Г. Шкорлупа, И.А. Гончарова, О.Е. Акбашева // **Бюллетень Сибирской медицины**. - 2011. - № 1. - С. 7 - 11.

Коллективная монография

58. Прогрессирование заболеваний печени вирусного и алкогольного генеза. Роль иммуногенетики и системы протеолиза / Е.В.Белобородова, Э.И.Белобородова, Н.В. Рязанцева, И.А. Гончарова, О.Е. Акбашева и др. - Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2008. - 150 с.

Патенты на изобретение

59. Пат. 2291440 РФ, МПК⁷ G 01 N 33/68. Способ диагностики стадии хронизации гепатита / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, Р.Ф. Абдрашитов, М.И. Рачковский, И.Л. Пурлик, О.Е. Акбашева и др. – заявка № 2005128374/15, 12.09.05; опубликовано 10.01.2007.

60. Пат. 22914441 РФ, МПК⁷ G 01 N 33/68. Способ диагностики цирроза печени / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, Р.Ф. Абдрашитов, М.И. Рачковский, И.Л. Пурлик, О.Е. Акбашева и др. - заявка № 2005128375/15, 12.09.05; опубликовано 10.01.2007.

61. Пат. 2359618 РФ, МПК⁷. А 61В10/00, G 01 N 33/68. Способ прогнозирования риска развития хронической обструктивной болезни легких у длительно курящих лиц / Г.Э. Черногорюк, А.А. Смотрова, Н.С Ямкина, О.Е. Акбашева и др.- Заявка № 2008115077/14, 16.04.08; опубликовано 27.06.2009

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- α_1 -ПИ – α_1 -протеиназный ингибитор
- α_2 -МГ – α_2 -макроглобулин
- БСО – белковосвязанный гидроксипролин
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- КСИ – кислотостабильные ингибиторы
- МДА – малоновый диальдегид
- ОМБ – окислительная модификации белков
- ОФВ1– объем форсированного выдоха за минуту
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ПСО – пептидно-связанный гидроксипролин
- СО – свободный гидроксипролин
- СОД – супероксиддисмутаза
- СРК – синдром раздраженного кишечника
- ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
- EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
- ERK – экстрацеллюлярно -регулируемая киназа
- МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа
- МЕК –киназа МАРК/ERK
- TGF- β – трансформирующий фактор роста бета