



УДК 616–092

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МОЧИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

Зинкевич О.Д.¹, Сафина Н.А.^{1,2}, Чикаев В.Ф.², Малков И.С.¹, Копорулина М.О.¹, Айдаров А.Р.³

¹ КГМА — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

² ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ

³ ГАУЗ «Городская больница № 7»

PROTEOLYTIC ENZYMES IN URINE AND BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS

Zinkevich O.D.¹, Safina N.A.^{1,2}, Chikaev V.F.², Malkov I.S.¹, Koporulina M.O.¹, Aydarov A.R.³

¹ KSMA — Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia

² FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia

³ REGIONAL clinical hospital № 7

Зинкевич Олег Данилович

Zinkevich Oleg D.

zinkevich_oleg@mail.ru

Зинкевич О.Д. — к.б.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ

Сафина Н.А. — к.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ

Чикаев В.Ф. — д.м.н., профессор кафедры травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний

Малков И.С. — д.м.н., профессор кафедры хирургии

Копорулина М.О. — научный сотрудник ЦНИЛ

Айдаров А.Р. — хирург

Zinkevich O.D. — PhD, leading researcher of central scientific research laboratory

Safina N.A. — PhD, senior researcher of central scientific research laboratory

Chikaev V.F. — D. Med.Sc. Professor of the Department of traumatology, orthopaedics and surgery of extreme States

Malkov I.S. — D. Med.Sc. Professor, head Department of surgery

Koporulina M.O. — researcher of central scientific research laboratory

Aydarov A.R. — surgeon

Резюме

Цель исследования — изучить спектр протеолитических ферментов и их распределение по молекулярным массам и типу активных центров в моче и в сыворотке крови у больных острым панкреатитом.

Материалы и методы. В исследование было включено 48 пациентов с диагнозом острый панкреатит и 19 здоровых добровольцев. У больных в динамике лечения и у здоровых определяли наличие и активность протеолитических ферментов в моче и сыворотке крови зимографическим методом.

Результаты. В моче больных острым панкреатитом не обнаружены ферменты, обладающие протеолитической активностью.

Все здоровые добровольцы стабильно показали в сыворотке наличие трех протеаз с молекулярными массами 170, 144 и 121 кДа, больные же имели дополнительные фракции — 121 кДа (n=24), 53 кДа, 42 кДа (n=5) и 23–26 кДа (n=18). Протеаза 121 кДа встречалась одинаково как при легкой, средней, так и тяжелой степени тяжести у 50 % больных. Протеазы 53, 42 и 23–26 кДа чаще встречались у больных с тяжелой степенью панкреатита. Активность протеаз 170 и 112 кДа у больных при поступлении в стационар была статистически значимо выше (p<0,05), чем в группе сравнения, и снижалась в процессе лечения. Протеазы, которые отсутствовали у здоровых лиц (121, 23 и 26 кДа), также снижали свою активность в процессе лечения, но к моменту выписки их активность в сыворотках больных все еще регистрировалась.

Заключение. В сыворотках больных острым панкреатитом обнаружен более широкий спектр протеаз по сравнению с контрольной группой. В моче пациентов с острым панкреатитом не выявлено протеолитических ферментов.

Ключевые слова: острый панкреатит, протеолитические ферменты, активность протеаз, сыворотка, моча, зимографический метод

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 147 (11): 86–91

Summary

The aim of the investigation was to study the spectrum of proteolytic enzymes and their distribution by molecular mass and type of active centers in the urine and serum of patients with acute pancreatitis.

Materials and methods. The study included 48 patients with acute pancreatitis and 19 healthy volunteers. In patients and in healthy was determined presence and activity of proteolytic enzymes in urine and serum gelatin gel zymography method.

Results. In the urine of patients with acute pancreatitis, no enzymes with proteolytic activity were found.

All healthy volunteers we showed the presence of three protease with molecular masses of 170, 144 and 121 kDa, patients had an additional protease — 121 kDa (n=24), 53 kDa, 42 kDa (n=5) and 23–26 kDa (n=18) in serum. The protease 121 kDa was presented in 50 % of patients of mild, moderate and severe degrees of severity. Protease 53kDa, 42kDa and 23–26 kDa were more often in severe patients. Protease activity of 170 kDa and 112 kDa was significantly higher ($p < 0.05$) than in healthy volunteers and decreased during the treatment. Protease that were absent in healthy volunteers (121, 23и 26 kDa) also decreased its activity in the treatment process, but the convalescence of patient was not accompanied by the disappearance of their activity.

Conclusions. In sera of patients with acute pancreatitis, a broader spectrum of proteases was found in comparison with healthy volunteers. In the urine of patients with acute pancreatitis, no enzymes with proteolytic activity were found.

Key words: acute pancreatitis, protease, protease activity, sera, urine, zymography method

Eksperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 147 (11): 86–91

Введение

Несмотря на интенсивные исследования в течение многих десятилетий, точный патогенез возникновения острого панкреатита до сих пор остается неизвестным.

Одной из ведущих гипотез развития острого панкреатита является преждевременная активация трипсина в ацинарных клетках [1]. Согласно этой теории, трипсин под действием различных факторов (эндо- и экзотоксинов, инфекционных агентов, ишемии, прямой травмы и др.) активируется в поджелудочной железе. Это приводит к каскаду реакций, в результате которых высвобождается большое количество провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода, а также

активируются другие протеолитические ферменты; развивается локальное или системное воспаление.

Роль и диагностическая значимость определения протеолитических ферментов в сыворотке крови и моче при остром панкреатите не достаточно определена, поэтому исследование их вклада в развитие и течение заболевания является актуальным.

Цель исследования – изучить спектр протеолитических ферментов и их распределение по молекулярным массам и типу активных центров в моче, сыворотке крови и фекалиях у больных острым панкреатитом

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 48 пациентов с диагнозом острый панкреатит, проходивших лечение в стационаре ГАУЗ городской больницы № 7 г. Казани в период с 2013 по 2017 год. В группу вошли больные легкой степени тяжести-21 человек, 19 – средней и 8 – тяжелой степени тяжести. Возраст пациентов колебался от 35 до 76 лет, составляя в среднем 45 ± 12 лет. Тяжесть состояния пациентов определяли согласно классификации острого панкреатита Российского общества

хирургов (2014) с учетом классификации Атланта-92 и ее модификаций. Все пациенты получали комплексное лечение согласно национальным клиническим рекомендациям российского общества хирургов.

У больных в динамике лечения определяли наличие и активность протеолитических ферментов в моче и сыворотке крови зимографическим методом. В качестве группы сравнения использовали сыворотку и мочу здоровых добровольцев.

Электрофорез биологических проб проводили в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением 2 % желатина (SIGMA). После проведения электрофореза гели промывали 3-хкратно 2,5 % раствором ТРИТОН X100 по 15 минут. Затем дважды по 10 минут – буфером для инкубации (ТРИС-буфер, pH 8,6). После промывки гели помещали в буфер для инкубации с соответствующими ингибиторами на 20 часов при температуре 37°C. Для выявления типа активных центров протеолитических ферментов использовали ЭДТА – ингибитор металл-зависимых ферментов, а также соевый ингибитор сериновых протеиназ. Через 20 часов гели фиксировали смесью воды, этанола и уксусной кислоты (0,45:0,45:0,1) и окрашивали Кумасси G-250.

Результаты исследования

При исследовании мочи пациентов острым панкреатитом нами не выявлено в них активности протеолитических ферментов (рис. 1А).

Для сравнения была проанализирована моча больного острым пиелонефритом. Как видно из рисунка, выявлено 3 фермента, обладающие желатинолитической активностью и имеющие молекулярные массы 173, 142 и 119 кДа (рис. 1 Б).

Нами были исследованы сыворотки 19 здоровых добровольцев на наличие в них ферментов, обладающих протеолитической активностью. Все добровольцы стабильно показали наличие трех ферментов с молекулярными массами 170, 144 и 121 кДа, (рис. 2А). Для того, чтобы определить тип активного центра этих ферментов, мы проводили инкубацию гелей в четырех вариантах: без ингибиторов, в присутствии ЭДТА, в присутствии соевого ингибитора, а также при их совместном использовании. Как видно из зимограммы, ферменты здоровых добровольцев, обладающие протеолитической активностью, полностью блокировались хелатором двухвалентных катионов – ЭДТА, что позволяет отнести их к металл-зависимым ферментам (рис. 1, Б).

У больных острым панкреатитом имелся более разнообразный спектр протеолитических ферментов по сравнению со здоровыми лицами.

По характеру распределения протеолитических ферментов в сыворотках, больных разделились на три группы: в одной группе больные имели спектр ферментов, не отличающийся от здоровых, другая группа имела дополнительный фермент с м.м. 121 кДа и, наконец, третья группа – имела несколько

Гель-документирование проводили на Doc-Print VX2. Активность ферментов рассчитывали по зоне просветления относительно трипсина с использованием программного обеспечения VisionCapt (VilberLourmat) и выражали в единицах протеолитической активности (ПУ/мл).

Статистическая обработка. Использовались методы описательной статистики. Описание признаков, имеющих небольшую выборку, представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана, Q1 и Q3 – соответственно первый и третий квартили. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием непараметрических критериев: критерии Манна – Уитни для межгруппового сравнения в двух независимых группах для количественных показателей.

дополнительных полос просветления с молекулярными массами от 23 до 170 кДа.

На рисунке 2 (Б) представлена зимограмма сывороток пациентов с острым панкреатитом при поступлении в стационар. Сравнение профиля ферментов больных с профилем здоровых выявило у больных дополнительной полосы просветления, соответствующей молекулярной массе 121 кДа. Активность этих протеиназ блокировалась добавлением в среду инкубации ЭДТА (рис. 2Г).

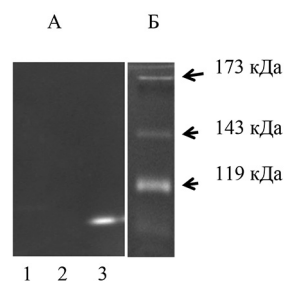
У части больных обнаружено большее количество фракций ферментов (рис. 2Д). Как видно из зимограмм, у этих больных выявлены дополнительные полосы просветления, соответствующие ферментам с молекулярными массами 23, 26, 43 и 52 кДа. Ферменты с м.м. 23 и 26 кДа относились к сериновым протеиназам, поскольку блокировались соевым ингибитором. Остальные ферменты были металл-зависимыми, так как в присутствии ЭДТА полностью теряли свою активность.

Больные острым панкреатитом имели разный профиль протеолитических ферментов в сыворотках, поэтому мы проанализировали частоту их встречаемости у больных в сравнении со здоровыми добровольцами (таблица 1). У больных и в группе сравнения во всех случаях определялись ферменты с молекулярными массами 170, 144 и 112 кДа. Из других ферментов наиболее часто у больных острым панкреатитом встречались ферменты с молекулярными массами 121 кДа и 23–26 кДа. Менее часто, ферменты с молекулярными массами 42 и 53 кДа.

Рисунок 1.

Зимограмма мочи больных острым панкреатитом и острым пиелонефритом:

А – 1,2 – больные острым панкреатитом, 3 – контроль трипсин
Б – острый пиелонефрит



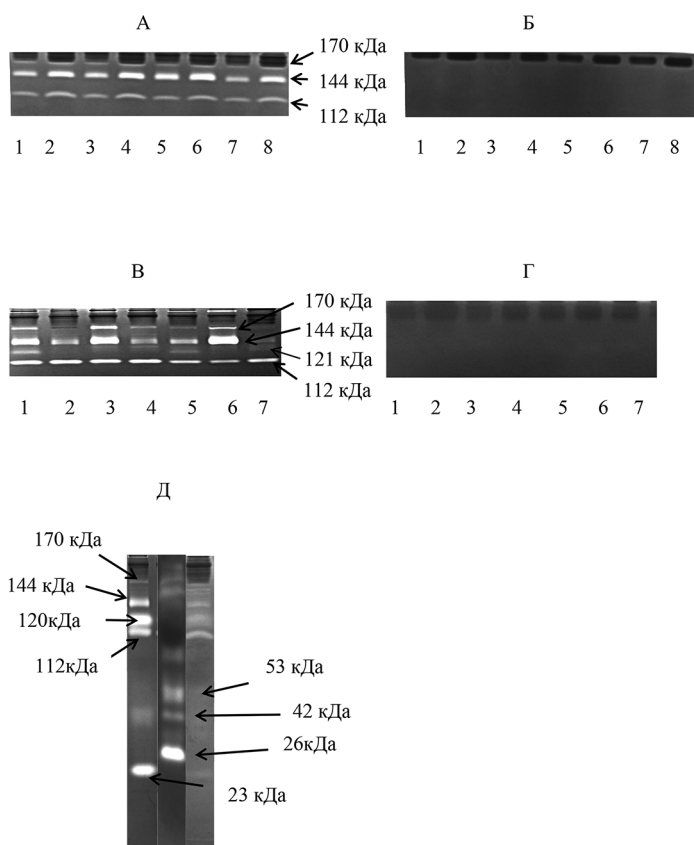


Рисунок 2.

Зимограммы сывороток здоровых добровольцев и больных острым панкреатитом
Здоровые добровольцы:
А. без ингибиторов
Б. в присутствии ЭДТА
Больные панкреатитом:
В. без ингибиторов
Г. в присутствии ЭДТА
Д. Зимограммы сывороток пациентов с тяжелой степенью острого панкреатита.

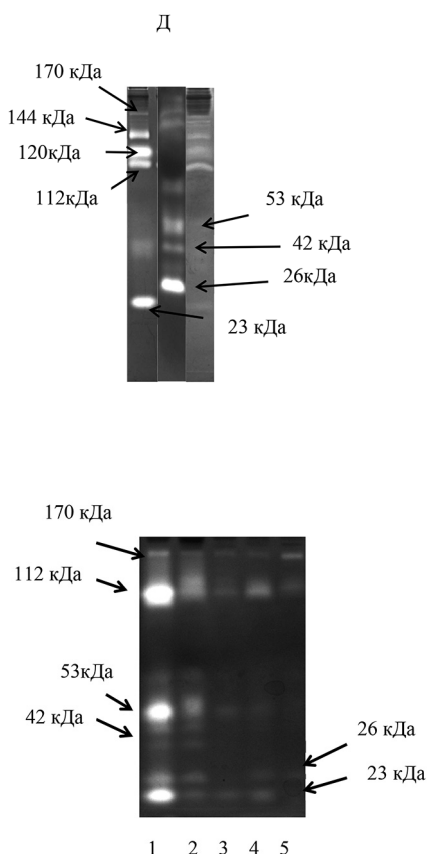


Рисунок 3.

Зимограмма пациента N в динамике лечения
1 – при поступлении в стационар
2–3 сутки
3–9 сутки
4–15 сутки
5 – при выписке

Анализ частот выявления ферментов у больных в зависимости от степени тяжести заболевания приведен в таблице 2.

Протеаза с м.м. 121 кДа встречалась при всех степенях тяжести у 50 % больных.

Протеазы с молекулярными массами 53, 42 и 23–26 кДа чаще встречались у больных с тяжелых формах панкреатита.

Исследование активности ферментов с различными молекулярными массами показало, что у больных активность протеолитических ферментов с м.м.170 и 112 кДа при поступлении в стационар была статистически значимо выше ($p < 0,05$), чем в группе сравнения. Активность фермента с м.м. 144 кДа не отличалась от показателей добровольцев (таблица 3).

В процессе лечения активность ферментов 170 кДа, 112 кДа значительно снижалась по сравнению с первоначальным уровнем (таблица 3), но до нормы так и не доходила; протеиназа 144 кДа оставалась без изменений на уровне здоровых добровольцев как до, так и после лечения.

Протеолитические ферменты, которые отсутствовали у здоровых добровольцев (ферменты с м.м. 121, 23, и 26 кДа), также снижали свою активность в процессе лечения, но к моменту выписки их активность в сыворотках больных все еще регистрировалась.

У небольшой части пациентов ($n=5$) были выявлены ферменты с м.м. 42–53 кДа, активность которых в процессе лечения снизилась, но до нулевых значений в процессе лечения не дошла (рис. 3).

Таблица 1.

Частота встречаемости протеиназ с различной молекулярной массой у больных острым панкреатитом

Группы обследуемых	Частота встречаемости ферментов								
	М.м	170 кДа	144 кДа	121 кДа	112 кДа	53 кДа	42 кДа	26 кДа	23 кДа
Острый панкреатит (n=49)	n	49	49	25	49	5	5	18	15
	%	100	100	51	100	10,2	10,2	36,7	30,6
Здоровые (n=19)	n	19	19	0	19	0	0	0	0
	%	100	100	0	100	0	0	0	0

Таблица 2.

Частота выявления ферментов у больных острым панкреатитом в зависимости от степени тяжести.

Молекулярные массы ферментов	Число больных с разной степенью тяжести					
	Легкая n=21		Средняя n=19		Тяжелая n=8	
	n	%	n	%	n	%
121 кДа	11	52	10	52	4	50
53 кДа	1	4,7	1	5,2	3	37,5
42 кДа	1	4,7	1	5,2	3	37,5
23–26 кДа	7	33,3	6	31,5	5	62

Таблица 3.

Активность протеолитических ферментов сыворотки крови у больных острым панкреатитом до и после лечения.

Примечание:

p – в сравнении со здоровыми добровольцами, p¹ – в сравнении с активностью до лечения

м.м ферментов, кДа	Активность протеолитических ферментов сыворотки крови у больных острым панкреатитом (ПУ/мл)		
	До лечения	После лечения	здоровые
170	1809 [1472;3196] p<0,05	1667[1090;1709] p<0,05 p ¹ <0,05	925,5[858;1294]
144	1825[1737;1944] p>0,05	2049[1606;2610] p>0,05p ¹ >0,05	2577[1599;2828]
112	5684[3148;7524] p<0,05	3629[1746;3953] p<0,05 p ¹ <0,05	1655 [1544;1855]
121	3717[2162;4458] p<0,05	3235[1995;3749] p<0,05 p ¹ <0,05	0
23–26	2237[2111;7408] p<0,05	0[0;1578] p<0,05 p ¹ <0,05	0

Обсуждение полученных результатов

Определение ферментов поджелудочной железы в моче и сыворотке крови является краеугольным камнем в диагностике острого панкреатита, поэтому нами, в первую очередь, была исследована моча на содержание протеолитических ферментов. В наших исследованиях ни в одном случае острого панкреатита нами не выявлено протеолитической активности в пробах мочи. Чтобы определить, применима ли данная методика для выявления протеаз в моче, была исследована моча больных острым пиелонефритом, в которой были обнаружены белки с молекулярными массами 119 кДа, 142 кДа и 174кДа, обладающие протеолитической активностью. Отсутствие протеаз в моче у больных острым панкреатитом, вероятно, можно объяснить формированием их комплексов с ингибиторами в плазме крови, и такие комплексы не фильтруется почками из-за их высокой молекулярной массы. Молекулярная масса, например, трипсина от 23 до 26 кДа; его комплекс с одним из ингибиторов – α-1-антитрипсином (м.м.50 кДа), уже будет иметь молекулярную массу 73–76 кДа, и его фильтрация, по-видимому, значительно снижена. В моче для диагностики панкреатита используется определение трипсиногена или трипсин-активирующего пептида (ТАП). Они имеют молекулярные массы 23 кДа и 900Да,

соответственно, но при этом, не обладают протеолитической активностью [2]. По-видимому, при достаточном уровне естественных ингибиторов, они связывают активированные протеолитические ферменты в плазме крови, комплексы которых не фильтруются почками и потому не определяются в моче. Исследование протеолитических ферментов сывороток крови показало их более разнообразный спектр у больных острым панкреатитом по сравнению со здоровыми добровольцами. У здоровых лиц протеолитические ферменты были представлены тремя фракциями с молекулярными массами 170,144 и 112 кДа, больные же имели дополнительные фракции – 121кДа (n=24), 53 кДа, 42 кДа (n=5) и 23–26кДа (n=18). Показатели активности каждой фракции ферментов, за исключением 144 кДа, у больных острым панкреатитом были значительно выше, чем у здоровых и не нормализовались к моменту выписки. Ферменты, которые были выявлены только у пациентов с острым панкреатитом, также снижали свою активность в процессе лечения и, в большинстве случаев, не доходили до нулевых значений. Обнаруженные нами протеолитические ферменты в сыворотке крови больных острым

панкреатитом, конечно, нуждаются в идентификации, что позволит, вероятно, установить их происхождение. Возможно, они появляются в циркуляции вследствие преждевременной активации трипсина в ацинарных клетках поджелудочной железы. Существует также и другая возможность – из-за повышенной проницаемости кишечника, как предполагается [3], пищеварительные ферменты попадают в системную циркуляцию, вызывая активацию других протеиназ, в частности, матриксных металлопротеиназ (ММП). В наших исследованиях у 50 % больных острым панкреатитом, вне зависимости от степени тяжести заболевания, была обнаружена активность протеазы с м.м. 121 кДа. Молекулярная масса фермента, а также ингибирование его активности ЭДТА позволили нам предположить, что этот фермент является димером ММП-9 (его м.м. 120 кДа). Данные наших исследований согласуются с некоторыми литературными данными. Известно, что синтез ММП-9 усиливается при воспалительных реакциях, в том числе и при остром панкреатите [4, 5]. Хотя биологический смысл существования димеров ММП-9 не известен, но их уровень повышается при многих заболеваниях. В работах [4] высокий уровень ММП-9 связывают с развитием панкреонекроза, однако, в наших исследованиях фермент с м.м. 121 кДа был обнаружен у больных при разной степени тяжести острого панкреатита, в том числе и при легкой.

В сыворотках больных нами также был обнаружен фермент с м.м. 23–26 кДа, активность которого в значительной степени менялась в динамике лечения. Поскольку он полностью блокировался соевым ингибитором трипсина и не ингибировался ЭДТА. Его молекулярная масса и электрофоретические характеристики совпадают с трипсином, поэтому мы предположили, что этот фермент является трипсином. Трипсин полностью отсутствовал у здоровых добровольцев, но был обнаружен у 30 % больных острым панкреатитом с одинаковой частотой при разной степени тяжести заболевания. Роль трипсина в развитии

острого панкреатита хорошо известна. По мнению некоторых авторов, он может быть ранним маркером тяжести и исхода острого панкреатита [6]. Считается, что его активность быстро снижается в первые 2–3 суток заболевания, однако, в наших исследованиях трипсин сохранялся в сыворотке больных даже на момент выписки.

Ферменты с м.м 53 и 42 кДа выявлены у больных острым панкреатитом как при легкой, так и при средней и тяжелой степени тяжести. Их активность полностью блокировалась ЭДТА, поэтому они являются металлопротеиназами. Какого происхождения данные ферменты – не известно. Возможно, один из них (53 кДа) – это ММП-2 с м.м 60 кДа, уровень которого повышается при многих воспалительных заболеваниях [7].

Известно также существование не гликозилированной формы ММП-9, которая имеет м.м. 57 кДа и транкализованной формы ММП-9 с м.м. 41,5 кДа [8]. Вероятно, обнаруженные нами ферменты 53 и 42 кДа в сыворотке больных панкреатитом, являются матриксными металлопротеиназами ММП-2 и (или) ММП-9, это предстоит установить в дальнейших исследованиях.

Таким образом, в сыворотке пациентов с острым панкреатитом обнаружены ферменты с молекулярными массами от 23 до 170 кДа, обладающие протеолитической активностью. Их активность при поступлении в стационар была повышена по сравнению со здоровыми добровольцами и снижалась в процессе лечения. Обнаруженные ферменты с м.м от 41 до 170 кДа являются металлопротеиназами, а фермент с м.м 23–26 кДа – сериновой протеиназой.

Появление протеолитических ферментов в циркуляции может приводить к активации провоспалительных цитокинов, повышению сосудистой проницаемости, активации фагоцитов и т.п., что, вероятно, способствует развитию заболевания.

Эти ферменты не обнаружены в моче, вероятно, за счет формирования комплексов с естественными ингибиторами (α -2 макроглобулином, α 1анти-трипсином, TIMP и др); это затрудняет их клиренс почками из-за высокой молекулярной массы.

Литература

1. Hirota M., Ohmuraya M., and H. Baba. /Genetic background of pancreatitis.// Postgrad. J. Med, 2006 82: 775–778
2. Johnson C. D., Lempinen M., Imrie C. W., P. Puolakkainen, E. Kemppainen, R Carter. and C. McKay. / Urinary trypsinogen activation peptide as a marker of severe acute pancreatitis // British Journal of Surgery 2004; 91: 1027–1033
3. Geert W. Schmid-Schönbein. / The autodigestion hypothesis: Proteolytic receptor cleavage in rheological and cardiovascular cell dysfunction1// Biorheology –1 (2017) 1–13
4. Chen P., Yuan Y., Wang S., Zhan L., Xu J. / Serum matrix metalloproteinase 9 as a marker for the assessment of severe acute pancreatitis // Tohoku J Exp Med. 2006 Mar;208(3):261–6
5. Guo J.I, Xue P., Yang X.N, Liu X.B, Huang W., Xia Q. / Serum matrix metalloproteinase-9 is an early marker of pancreatic necrosis in patients with severe acute pancreatitis // Hepatogastroenterology. 2012 Jul-Aug;59(117):1594–8
6. Johnson C. D., Lempinen M., Imrie C. W., P. Puolakkainen, E. Kemppainen, R Carter. and C. McKay. / Urinary trypsinogen activation peptide as a marker of severe acute pancreatitis // British Journal of Surgery 2004; 91: 1027–1033
7. Elin Hadler-Olsen, Bodil Fadnes, Ingebrigt Sylte, Lars Uhlin-Hansen, Jan-Olof Winberg. / Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease // FEBS Journal Volume 278, Issue 1, pages 28–45, January 2011
8. Bu C. H., Pourmotabbed T / Mechanism of Ca²⁺ dependent activity of human neutrophil gelatinase // J Biol-Chem 271–14308–14315. 1996