

УДК 616.34-036.12-091.8-018.2:577.1

## Активность трипсиноподобных протеиназ и деградация коллагена слизистой оболочки кишечника при заболеваниях желудочно-кишечного тракта

О.Е. Акбашева<sup>1</sup>, В.А. Бурковская<sup>2</sup>, А.Е. Деханд<sup>1</sup>, Э.И. Белобородова<sup>2</sup>,  
Л.А. Акимова<sup>3</sup>, Е.Л. Наумова<sup>3</sup>, Е.А. Квач<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биохимии и молекулярной биологии,

<sup>2</sup>Кафедра терапии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Сибирского государственного медицинского университета,

<sup>3</sup>Кафедра терапии Томского военно-медицинского института,

<sup>4</sup>Эндоскопическое отделение областной клинической больницы, г. Томск)

### Activity trypsin-like proteinases and intestinal mucosa collagen degradation at gastro-intestinal diseases

O.E. Akbasheva, V.A. Burkovskaya, A.E. Dehand, E.I. Beloborodova,  
L.A. Akimova, E.L. Naumova, E.A. Kvach

**Цель исследования.** Определить активность трипсино-, коллагеназо-, эластазоподобных протеиназ,  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора,  $\alpha_2$ -макроглобулина и содержание гидроксипролина в слизистой оболочке кишки и в плазме крови больных с заболеваниями кишечника.

**Материал и методы.** Обследовано 60 пациентов с язвенным колитом, 42 – с болезнью Крона, 18 – с синдромом раздраженного кишечника и 30 практически здоровых лиц. Супернатант, полученный из биоптатов слизистой оболочки кишечника, использовали для определения биохимических показателей. Активность трипсиноподобных протеиназ оценивали по гидролизу синтетического

**Aim of investigation.** To determine activity of trypsin-, collagenase- and elastase-like proteinases,  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor,  $\alpha_2$ -macroglobulin and contents of hydroxyproline in intestinal mucosa and blood plasma of patients with bowel diseases.

**Material and methods.** Sixty patients with ulcerative colitis, 42 – with Crohn's disease, 18 - with irritable bowel syndrome and 30 practically healthy persons were investigated. A supernatant, obtained from biopsy specimens of intestinal mucosa, was used for assessment of biochemical parameters. Activity of trypsin-like proteinases was estimated by hydrolysis of synthetic substrate *N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE). Activity of  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) and  $\alpha_2$ -macro-

**Акбашева Ольга Евгеньевна** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»). Контактная информация для переписки: akbashoe@yandex.ru; 634050, г. Томск, Московский тракт 2, ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, кафедра биохимии и молекулярной биологии

**Бурковская Вера Антоновна** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры терапии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

**Деханд Анна Евгеньевна** – интерн кафедры биохимии и молекулярной биологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

**Белобородова Эльвира Ивановна** – доктор медицинских наук, профессор кафедры терапии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

**Акимова Лидия Алексеевна** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры терапии Томского военно-медицинского института

**Наумова Елена Леонидовна** – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры терапии Томского военно-медицинского института

**Квач Елена Анатольевна** – зав. отделением эндоскопии ОГУЗ «Томская областная клиническая больница»

субстрата *N*-бензоил-*L*-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ). Активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора ( $\alpha_1$ -ПИ) и  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $\alpha_2$ -МГ) определяли унифицированным методом по торможению гидролиза БАЭЭ. Дегградацию фибриллярных белков соединительной ткани оценивали по активности эластазо- и коллагеназоподобных протеиназ и содержанию фракций гидроксипролина. Активность эластазо- и коллагеназоподобных протеиназ определяли, используя в качестве субстрата соответственно *N*-бутил-оксикарбонил-*L*-аланин-пара-нитрофениловый эфир (БАНЭ).

**Результаты.** Выявлена активация протеолиза в слизистой оболочке кишечника и плазме крови больных на фоне снижения активности ингибиторов протеиназ и повышения содержания гидроксипролина. Изменения наиболее выражены при болезни Крона по сравнению с язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника. При язвенном колите с нарастанием степени его тяжести повышаются активность трипсино-, эластазоподобных протеиназ и уровень свободного гидроксипролина слизистой оболочки кишечника. Методом логистической регрессии рассчитано, что дефицит  $\alpha_2$ -МГ в 3,85 раза увеличивает риск развития болезни Крона.

**Заключение.** При язвенном колите и болезни Крона в слизистой оболочке кишечника наблюдается активация трипсино-, эластазо- и коллагеназоподобных протеиназ на фоне снижения активности  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ, что приводит к дегградации соединительнотканых белков. Наиболее выраженное нарушение метаболизма коллагена и эластина, выражающееся в значительном увеличении продуктов распада коллагена, активности протеиназ на фоне дефицита ингибиторов в слизистой оболочке кишечника и плазме крови происходит при болезни Крона.

**Ключевые слова:** трипсиноподобные протеиназы,  $\alpha_1$ -протеиназный ингибитор,  $\alpha_2$ -макроглобулин, фракции гидроксипролина, коллагеназо-, эластазоподобные протеиназы, болезнь Крона, язвенный колит, синдром раздраженного кишечника.

**Т**рипсиноподобные протеиназы плазмы крови способны влиять на процессы внутриклеточного метаболизма через активацию интегральных мембранных белков PARs (proteinase activated receptors), приводя к запуску множеством путей внутриклеточной сигнальной трансдукции. Связывание трипсина и тромбина с внеклеточной петлей PAR-2 и PAR-1 сопровождается активацией фосфолипазы C, протеинкиназы C, Pyk2, Raf1, Src, JAKs, MAPK, NF-kB, STAT2, STAT3 [22, 24], увеличением концентрации InsP3, Ca<sup>2+</sup> и DAG, ПГЕ2, ПГФ1 $\alpha$  и повышением активности матриксных металлопротеиназ [28].

Активация трипсином и тромбином PARs, локализованных в желудке и кишке, стимулирует

секрецию пепсина [25, 26], вызывает диарею при воспалении [19, 20]. Стимуляция рецепторов происходит при повреждении кишечника и проникновении протеиназ в интерстиций [21, 29, 30]. Предрасполагающим фактором повышенной активности трипсиноподобных протеиназ является дефицит их ингибиторов [2, 5]. Генетическая или приобретенная недостаточность ингибиторов протеиназ, таких как  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина, может способствовать неконтролируемой активации протеолиза, повышению активности коллагеназо- и эластазоподобных ферментов, вызывая дегградацию коллагеновых и эластиновых волокон и изъязвление стенки кишки [6, 12, 17, 27].

**Results.** Activation of proteolysis in mucosa of intestine and blood plasma of patients on a background of decrease of activity of proteinase inhibitors and elevation of hydroxyproline contents was revealed. Changes were most severe at Crohn's disease in comparison to ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. At ulcerative colitis along with increase of severity grade activity of trypsin-, elastase-like proteinases and level of free hydroxyproline of intestinal mucosa increased. By logistical regression method it was calculated, that deficiency of  $\alpha_2$ -MG increases the risk of Crohn's disease development 3,85 times.

**Conclusion.** At ulcerative colitis and Crohn's disease in mucosa of intestine activation of trypsin-, elastase- and collagenase-like proteinases on a background of decrease of activity of  $\alpha_1$ -PI and  $\alpha_2$ -MG that results in degradation of connective tissue proteins is observed. The most severe disorder of collagen and elastin metabolism, i.e. substantial increase of collagen decomposition products, proteinases activity on the background of deficiency of inhibitors in mucosa of intestine and blood plasma occurs in Crohn's disease.

**Key words:** trypsin-like proteinases,  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor,  $\alpha_2$ -macroglobulin, hydroxyproline fractions, collagenase-like, elastase-like proteinases, Crohn's disease, ulcerative colitis, irritable bowel syndrome.

Активация протеолитических ферментов играет существенную роль в патогенезе желудочно-кишечных заболеваний. Практическое здравоохранение столкнулось сегодня с серьезной проблемой широкого распространения среди населения функциональных и деструктивных заболеваний *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ). Среди функциональных нарушений широко представлен синдром раздраженного кишечника, который проявляется нарушением моторики кишки и не сопровождается визуальными органическими изменениями [4, 6]. К деструктивным заболеваниям относятся язвенный колит и болезнь Крона, при развитии которых происходит повреждение слизистой оболочки кишки и образуются язвы. Клиническая картина и морфологические проявления язвенного колита и болезни Крона во многом сходны. Однако считается, что при болезни Крона язвенный процесс затрагивает все слои кишечника, осложняясь пенетрацией и образованием свищей [13]. Степень деградации определяется по продукту распада коллагена — гидроксипролину. Исследование тканей кишечника, которое может дать более полную картину воспалительно-деструктивного процесса, до настоящего времени не проводилось. В связи с этим изучение активности трипсиноподобных протеиназ и показателей деградации соединительной ткани при заболеваниях ЖКТ будет иметь важное диагностическое и прогностическое значение.

**Цель** исследования заключалась в изучении содержания фракций гидроксипролина, активности трипсино-, коллагеназо-, эластазоподобных протеиназ, их ингибиторов в слизистой оболочке кишки и плазме крови пациентов с синдромом раздраженного кишечника, язвенным колитом и болезнью Крона.

## Материал и методы исследования

Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом. Обязательным условием включения в обследование было информированное согласие его участников. В исследование были включены 120 человек в возрасте 20–60 лет, отобранных согласно Римским критериям II–III (*основная группа*). У 60 пациентов диагностирован язвенный колит (31 женщина и 29 мужчин), у 42 — болезнь Крона (23 мужчины и 19 женщин) и у 18 — синдром раздраженного кишечника (среди последних преобладали женщины в возрасте 20–30 лет). Верификация диагноза проводилась с помощью колонофиброскопии, биопсии слизистой оболочки толстой кишки и комплекса общеклинических исследований для оценки тяжести основного процесса. С целью исключения инфекционной бактериальной патологии использовались микробиологические и серологические методы диагностики на выявление преимущес-

твенных групп патогенных кишечных микроорганизмов. *Контрольная группа* включала 30 практически здоровых лиц и была сопоставима по характеристикам с основной группой.

В соответствии с классификацией Trulove и Witts по тяжести течения **язвенного колита** были выделены 3 подгруппы: легкая степень — 24 человека, средняя — 26 и тяжелая — 10. При легкой степени преобладали дистальные поражения толстой кишки (проктосигмоидит — 50% больных, левостороннее — 33,3%, тотальное — 16,7%). При морфологическом исследовании слизистой оболочки толстой кишки в этих случаях обнаружена хроническая воспалительная инфильтрация, в основном лимфоплазмочитарная с примесью эозинофилов и иногда нейтрофилов. При средней степени тяжести проктосигмоидит диагностирован лишь у 2 человек (7,7%), а на долю левостороннего и тотального процессов приходилось 30,8 и 61,5% соответственно, дополнительно выявлены эрозивно-язвенные изменения в сочетании с крипт-абсцессами. Тяжелая степень была представлена доминирующей тотальной локализацией поражения (80%) при наличии левостороннего у 20% человек с отсутствием локализации по типу проктосигмоидита. При тяжелом течении заболевания у 80% больных выявлена воспалительная инфильтрация, у 40% из них — с фиброзными изменениями, у 40% — с эрозивно-язвенными в сочетании с крипт-абсцессами. Биоптаты брали из зон с визуально максимально выраженным воспалением.

Среди пациентов с **болезнью Крона** было 17 человек с легкой степенью ее тяжести, 12 — со средней и 13 — с тяжелой. Легкое течение колита отмечено у 7 (41,2%) больных, илеоколит — у 3 (17,6%), изолированный терминальный илеит — у 5 (29,4%), с дополнительным вовлечением зоны тощей кишки — у 2 (11,8%). При средней степени тяжести чаще встречались пациенты с колитом — 8 (66,7%), а на долю изолированного терминального илеита пришлось 2 наблюдения (16,7%), илеоколита и болезни Крона с вовлечением тощей кишки — по 1 случаю (8,3%). Для тяжелой степени типичным явилось отсутствие больных с изолированным терминальным илеитом при наличии колита у 6 (46,2%) человек, илеоколита — у 4 (30,8%) и патологического процесса с вовлечением участка тощей кишки — у 3 (23,0%). Для болезни Крона характерна полиморфная эндоскопическая картина, иногда сочетающая разные степени воспалительного процесса. На начальном этапе развития болезни появляются участки очагового отека и гиперемии слизистой оболочки, в дальнейшем присоединяются поверхностные очерченные афтоидные язвы с тенденцией к сливному процессу, приводящие на поздних этапах к формированию щелевидных продольных язв и картины «булыжной мостовой». Полученные у наблюдав-

шихся больных морфологические образцы соответствовали участкам максимальных изменений слизистой оболочки кишечника, независимо от локализации поражения. При проведенном исследовании выявлены воспалительная инфильтрация в слизистой оболочке толстой кишки, глубокие щелевидные язвы, разрастание грануляционной ткани, гиперплазия лимфоидных фолликулов, фиброзные изменения и редко крипт-абсцессы. Гранулемы не были найдены, что, вероятно, связано с глубиной поражения при болезни Крона, частым их расположением в подслизистом слое.

У больных с **синдромом раздраженного кишечника**, несмотря на отсутствие визуальных признаков повреждения последнего, морфологические воспалительные изменения обнаружены в 83,3% случаев, а атрофические изменения — в 22,2%. В биоптатах выявлялись поверхностные отек и инфильтрация слизистой оболочки, представленная преимущественно мононуклеарными клетками (с незначительным содержанием лейкоцитов, низкой степени плотности). Как правило, эти изменения отмечались при наличии в клинической картине диарейного компонента.

Биоптат слизистой оболочки кишечника получали с помощью колонофиброскопии, гомогенизировали в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,2), содержащем 150 мМ NaCl, подвергали однократно «замораживанию-оттаиванию», центрифугировали 15 мин при 1500 об./мин. Супернатант использовали для определения биохимических показателей.

Активность трипсиноподобных протеиназ оценивали по гидролизу синтетического субстрата *N*-бензоил-*L*-аргинин-этилового эфира — БАЭЭ (ICN, Biomedicals Inc, USA) [10]. Активность  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора ( $\alpha_1$ -ПИ) и  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $\alpha_2$ -МГ) определяли унифицированным методом по торможению гидролиза БАЭЭ (ICN, Biomedicals Inc, USA) [9]. Деградацию фибриллярных белков соединительной ткани оценивали по активности эластазо- и коллагеназоподобных протеиназ и содержанию фракций гидроксипролина. Активность эластазо- и коллагеназоподобных протеиназ определяли, используя в качестве субстрата соответственно *N*-бутил-оксикарбонил-*L*-аланин-пара-нитрофениловый эфир — БАНЭ (ICN, Biomedicals Inc, USA) и коллаген I типа (Sigma, Germany) [10, 15]. Содержание гидроксипролина изучали по цветной реакции с диметилбензальдегидом [14]. Исследовали содержание свободного, пептидно- и белковосвязанного гидроксипролина при разных условиях выделения фракций [8, 14].

Статистическая обработка данных выполнена с применением пакета программ SPSS 11.5 for Windows. Для оценки значимости различия показателей в группах предварительно определяли соответствие полученных выборок нормальному

закону распределения. Использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Для определения взаимосвязи между изучаемыми показателями рассчитывали коэффициент корреляции (тест Спирмена). При анализе связи между несколькими независимыми и зависимой переменными применяли мультиномиальная логистическая регрессия.

## Результаты исследования и их обсуждение

Деструктивные заболевания кишечника характеризовались увеличением активности трипсиноподобных протеиназ (табл. 1). При язвенном колите в слизистой оболочке кишечника она увеличивалась в 1,8 раза относительно показателей при синдроме раздраженного кишечника. При болезни Крона возрастала более выражено по сравнению с язвенным колитом (в 1,8 раза) и превышала показатели при синдроме раздраженного кишечника (в 3,2 раза).

Активность трипсиноподобных протеиназ увеличивалась и в плазме крови: при синдроме раздраженного кишечника — в 2,8 раза (до  $183,2 \pm 18,8$  нмоль/мин·мл), при язвенном колите — в 3,3 раза (до  $213,9 \pm 20,6$  нмоль/мин·мл) относительно практически здоровых лиц ( $65,1 \pm 4,6$  нмоль/мин·мл). У пациентов с болезнью Крона этот показатель возрастал в 4,6 раза (до  $297,9 \pm 18,9$  нмоль/мин·мл) по сравнению с практически здоровыми лицами и в 1,4 раза — с больными язвенным колитом. Высокая активность трипсиноподобных протеиназ может являться признаком активации процессов кининогенеза [11], обеспечивающего усиленное кровоснабжение кишечника при дискинезии.

Активация протеолиза в слизистой оболочке кишечника при болезни Крона сопровождалась дефицитом ингибиторов протеиназ: активность  $\alpha_1$ -ПИ была на 33%, а  $\alpha_2$ -МГ на 36% ниже, чем у больных язвенным колитом (см. табл. 1). В плазме крови больных язвенным колитом она уменьшалась соответственно на 21 и 34%, а при болезни Крона — на 43 и 51% относительно контроля ( $26,4 \pm 0,9$  ИЕ/мл для  $\alpha_1$ -ПИ и  $3,9 \pm 0,1$  ИЕ/мл для  $\alpha_2$ -МГ). Эти изменения, вероятно, связаны с истощением ингибиторного потенциала на фоне высокой активности протеиназ в течение длительного патологического процесса [3, 11]. Продолжительность заболевания при язвенном колите до 1 года зарегистрирована у 28,3% больных, 2–5 лет — у 38,3%, 6–10 лет — у 15%, более 10 — у 18,4%; при болезни Крона — соответственно у 21,4, 42,8, 14,3 и 21,5% обследованных. Дефицит  $\alpha_1$ -ПИ, очевидно, приводит к неконтролируемой активации протеолитических ферментов, деструкции ткани, язвенным поражениям кишечника и развитию болезни Крона

Таблица 1

Активность трипсиноподобных протеиназ, их ингибиторов в слизистой оболочке кишки и показатели деградации фибриллярных белков соединительной ткани при синдроме раздраженного кишечника, язвенном колите и болезни Крона,  $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$

Показатель	Синдром раздраженного кишечника, $n=9$	Язвенный колит, $n=53$	Болезнь Крона, $n=36$	Достоверность различий
	1	2	3	
Трипсиноподобные протеиназы, нмоль/мин·мг белка	182,3±14,7	321,8±14,1	576,0±60,5	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
$\alpha_1$ -ПИ, мИЕ/мг	2,9±0,4	2,6±0,1	1,8±0,2	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
$\alpha_2$ -МГ, мИЕ/мг	0,26±0,02	0,2±0,02	0,14±0,03	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
Коллагеназоподобные протеиназы, мкмоль/ч·мг белка	20,5±1,5	29,6±1,1	37,0±2,7	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
Эластазоподобные протеиназы, нмоль/мин·мг белка	156,7±6,7	392,7±19,3	452,2±34,3	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}>0,05$
Свободный гидроксипролин (СО), мкг/мг	86,9±6,0	101,5±4,1	106,4±4,1	$p_{1-2}>0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}>0,05$
Пептидно-связанный гидроксипролин (ПСО), мкг/мг	15,6±0,3	14,8±0,6	12,2±0,2	$p_{1-2}>0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
СО/ПСО	5,5	6,9	8,7	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$

[14, 18, 27]. Методом логистической регрессии рассчитано, что низкая активность  $\alpha_1$ -ПИ и  $\alpha_2$ -МГ увеличивает риск развития болезни Крона соответственно в 1,1 и в 3,85 раза.

В слизистой оболочке кишки при деструктивных заболеваниях кишечника выявлено увеличение активности ферментов, гидролизующих фибриллярные белки соединительной ткани. Так, активность коллагеназо-, эластазоподобных протеиназ при язвенном колите возрастала соответственно в 1,4 и в 2,5 раза, а при болезни Крона – в 1,8 и 2,9 раза (см. табл. 1). Повышение показателей эластазоподобных протеиназ может свидетельствовать о наличии воспалительного процесса в организме, так как источником эластазы могут быть нейтрофилы, инфильтрирующие слизистую оболочку кишечника на фоне ее гиперемии и усиленной моторики [6, 16]. Нейтрофильная эластаза также снижает синтез PGI<sub>2</sub> эндотелия, в связи с чем уменьшаются защитные функции слизистой оболочки ЖКТ и образуются язвы [23]. Методом корреляционного анализа обнаружена связь между активностью эластазоподобных протеиназ слизистой оболочки кишки и активностью трипсиноподобных ( $r_{xy}=0,65$ ) и коллагеназоподобных ( $r_{xy}=0,57$ ) протеиназ плазмы крови,

предполагающая однонаправленность изменений протеолиза тканей и плазмы крови. Установлено также, что при язвенном колите активность коллагеназоподобных протеиназ находится под контролем ингибитора  $\alpha_2$ -МГ ( $r=-0,63$ ), в то время как при болезни Крона подобная взаимосвязь отсутствует ( $p>0,05$ ).

Увеличение активности коллагеназо- и эластазоподобных протеиназ на фоне дефицита их ингибиторов может служить патогенетическим фактором повышенной деградации соединительной ткани и изъязвлений слизистой оболочки кишечника. При изучаемых деструктивных заболеваниях отмечена деградация соединительной ткани, т. е. возрастание содержания свободного гидроксипролина и снижение пептидно-связанного гидроксипролина (см. табл. 1). Гидроксипролин является маркерной аминокислотой, по которой судят о скорости распада коллагена [8, 14]. Считают, что преобладание свободного гидроксипролина и увеличение коэффициента отношения *свободного гидроксипролина к пептидно-связанному* (СО/ПСО) отражает интенсивность процессов деградации коллагена [1, 7, 14]. Изменения были минимальными при синдроме раздраженного кишечника и максимальными при болезни Крона.

Таблица 2

Активность протеиназ слизистой оболочки кишки и соотношение СО/ПСО  
в зависимости от степени тяжести язвенного колита,  $x \pm m_x$

Показатель	I степень тяжести, n=34	II степень тяжести, n=43	III степень тяжести, n=24
	1	2	3
Трипсиноподобные протеиназы, нмоль/мин·мг белка	281,18±21,87	319,48±22,48 $p_{1-2}>0,05$	380,62±28,12 $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
Коллагеназоподобные протеиназы, мкмоль/ч·мг белка	28,68±1,81	30,19±1,91 $p_{1-2}>0,05$	30,15±2,21 $p_{1-3}>0,05$ $p_{2-3}>0,05$
Эластазоподобные протеиназы, нмоль/мин·мг белка	319,91±26,31	415,68±29,34 $p_{1-2}<0,05$	460,91±43,47 $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}>0,05$
СО/ПСО	5,4	6,8 $p_{1-2}<0,05$	8,6 $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$

Таблица 3

Активность протеиназ слизистой оболочки кишки и соотношение СО/ПСО  
в зависимости от степени тяжести болезни Крона,  $x \pm m_x$

Показатель	I степень тяжести, n=15	II степень тяжести, n=21	III степень тяжести, n=11
	1	2	3
Трипсиноподобные протеиназы, нмоль/мин·мг белка	628,93±112,39	507,61±108,44 $p_{1-2}>0,05$	521,61±106,22 $p_{1-3}>0,05$ $p_{2-3}>0,05$
Коллагеназоподобные протеиназы, мкмоль/ч·мг белка	36,94±4,05	33,23±4,40 $p_{1-2}>0,05$	34,71±5,19 $p_{1-3}>0,05$ $p_{2-3}>0,05$
Эластазоподобные протеиназы, нмоль/мин·мг белка	417,38±51,16	454,29±60,39 $p_{1-2}>0,05$	420,76±65,44 $p_{1-3}>0,05$ $p_{2-3}>0,05$
СО/ПСО	8,0	7,9 $p_{1-2}>0,05$	10,9 $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$

Сказанное свидетельствует о поражении стенки кишечника за счет активации протеолиза и последующем разрушении коллагеновых и эластиновых волокон при синдроме раздраженного кишечника, язвенном колите и особенно болезни Крона.

При анализе полученных данных в зависимости от степени тяжести деструктивного заболевания установлена более выраженная активация трипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишки при язвенном колите. В случае его тяжелого течения активность трипсиноподобных ферментов была в 1,4 раза выше по сравнению с легкой формой (табл. 2). От степени тяжести язвенного колита зависела выраженность дегенерации соединительной ткани. Так, активность эластазоподобных протеиназ в слизистой оболочке кишки при тяжелом течении болезни была в 1,4 раза выше, чем при легком. Повышалось и содержание свободного гидроксипролина – до 130,50±8,57 мкг/мг, что было в 1,6 раза выше по сравнению с легким

течением болезни. В 1,6 раза возрастал также коэффициент соотношения СО/ПСО.

В плазме крови увеличение содержания свободного гидроксипролина в отличие от других изучаемых показателей также зависело от тяжести течения язвенного колита. При легкой степени оно составило 1,89±0,12 мкг/мл, при средней – 2,13±0,20 мкг/мл, а при тяжелой – 2,99±0,21 мкг/мл ( $p<0,05$ ). По мере прогрессирования язвенного колита содержание пептидно-связанного гидроксипролина снижалось с 0,22±0,01 мкг/мл (легкая степень) до 0,16±0,02 мкг/мл (тяжелая степень).

При болезни Крона в отличие от язвенного колита (табл. 3) не выявлено существенной зависимости исследуемых показателей от степени тяжести заболевания за исключением содержания гидроксипролина. Коэффициент соотношения СО/ПСО при тяжелом течении болезни у этих пациентов был в 1,4 раза выше, чем при легком. Обращает внимание отсутствие отличий в

содержании гидроксипролина при легкой и средней степени тяжести болезни Крона. Схожесть результатов в таких случаях может быть обусловлена тем, что патологический процесс при болезни Крона начинается всегда с подслизистого слоя и поверхностные изменения могут быть не столь ярко выражены, как при тяжелой степени. Кроме того, при болезни Крона в кишечнике рядом формируются различные по тяжести морфологических проявлений участки, которые могут попадать в зоны биопсии, в связи с чем одной морфологической картине могут соответствовать различные степени тяжести заболевания.

## Заключение

При язвенном колите и болезни Крона в слизистой оболочке кишечника больных наблюдается активация трипсино-, эластазо- и коллагеназоподобных протеиназ на фоне снижения активности  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора и  $\alpha_2$ -макроглобулина, что приводит к деградации соединительнотканых белков. Наиболее выраженное нарушение метаболизма коллагена и эластина, выражающееся в

значительном увеличении продуктов распада коллагена, повышении активности протеиназ на фоне дефицита ингибиторов в слизистой кишечника и плазме крови, происходит при болезни Крона. Диффузный однотипный характер распространения процесса по слизистому и подслизистому слоям при язвенном колите отчетливо нарастает в зависимости от степени тяжести заболевания, что подтверждается пропорциональным увеличением активности протеолиза и деградацией соединительной ткани в слизистой оболочке кишечника. При болезни Крона имеются большие различия в зонах протяженности пораженной ткани, в глубине поражения у разных больных, подчас в пределах одного биоптата, что, возможно, приводит к отсутствию прямо пропорциональной зависимости показателей протеолиза от степени тяжести заболевания, несмотря на значительные изменения исследуемых параметров. Интегральный коэффициент соотношения содержания свободного и пептидно-связанного гидроксипролина коррелирует со степенью тяжести заболевания и может использоваться как дополнительный диагностический критерий оценки состояния больных.

## Список литературы

1. Бычкова В.И., Смирнова Б.И., Лесничук Л.В. Биохимические показатели соединительной ткани в диагностике начальной стадии цирроза печени // Клини. лаб. диагностика. — 2003. — № 1. — С. 10–14.
2. Веремеенко К.Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения в клинике // Врач. дело. — 1994. — № 1. — С. 8–13.
3. Загромава Т.А., Акбашева О.Е., Ермаков С.Ю. Активность ингибиторов протеиназ плазмы крови при язвенной болезни в зависимости от морфофенотипа конституции больных // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2007. — Т. 17, № 4. — С. 30–35.
4. Златкина А.Р. Синдром раздраженного кишечника // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2000. — Т. 10, № 1. — С. 13–17.
5. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М., Левченко В.Г. Универсальный регулятор —  $\alpha_2$ -макроглобулин // Клини. лаб. диагностика. — 2004. — № 11. — С. 18–21.
6. Исламова Е.А. Оценка эффективности терапии синдрома раздраженного кишечника и НЯК по маркерам метаболизма соединительной ткани и серотонинсекретирующих клеток толстой кишки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Саратов, 2004. — 22 с.
7. Корепанов А.М., Шкляев А.Е., Шараев П.Н. Особенности метаболизма коллагена при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Клини. лаб. диагностика. — 2005. — № 5. — С. 14–16.
8. Кузнецова К.П., Прошина Л.Я., Приваленко М.Н. Модификация содержания оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. — 1998. — № 8. — С. 8–10.
9. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности  $\alpha_1$ -антитрипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека // Вопросы мед. химии. — 1979. — Т. 25, № 4. — С. 494–499.
10. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Пасхина Т.С. Измерение активности трипсино- и эластазоподобных протеиназ полиморфноядерных лейкоцитов и уровня их кислотостабильных ингибиторов в бронхиальном секрете человека. — М.: МГУ, 1984. — 14 с.
11. Пехтерева-Донченко Е.В. Состояние кининогеназа у детей при язвенной болезни и хроническом гастродуодените: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Томск, 2000. — 15 с.
12. Пузырев В.П., Савюк В.Я. Клинико-генетические аспекты недостаточности  $\alpha_1$ -антитрипсина // Мед. генетика. — 2002. — № 5. — С. 202–209.
13. Халиф И.Л., Лоранская И.Д. Воспалительные заболевания кишечника: неспецифический язвенный колит и болезнь Крона (Клиника, диагностика и лечение). — М., 2004. — 200 с.
14. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. — 1981. — № 5. — С. 283–285.
15. Шараев П.Н., Пишков В.Н., Заворыгина Н.Г. Определение коллагенолитической активности плазмы крови // Лаб. дело. — 1987. — № 1. — С. 60–62.
16. Akutsu H., Iwama H. Concentrative relationship between polymorphonuclear elastase and urinary trypsin inhibitor in amniotic fluid // Arch. Gynecol. Obstet. — 2000. — Vol. 263, N 4. — P. 156–159.
17. Audrain M.A., Sesboue R., Baranger T.A. et al. Analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): frequency and specificity in a sample of 191 homozygous (PiZZ) alpha1-antitrypsin-deficient subjects // Nephrol. Dial. Transplant. — 2001. — Vol. 16, N 1. — P. 39–44.
18. Biancone L., Onali S., Calabrese E. et al. Non-invasive techniques for assessing postoperative recurrence in Crohn's disease // Dig. Liver Dis. — 2008. — Vol. 40 (suppl 2). — P. 265–270.
19. Buresi M.C., Buret A.G., Hollenberg M.D. et al. Activation of proteinase-activated receptor 1 stimulates epithelial chloride secretion through a unique MAP kinase- and cyclo-oxygenase-dependent pathway // FASEB J. — 2002. — N 16. — P. 1515–1525.
20. Buresi M.C., Schleihauf E., Vergnolle N. et al. Protease-activated receptor-1 stimulates Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> secretion in human intestinal epithelial cells // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2001. — Vol. 281. — P. 323–332.
21. Bustos D., Negri G., De Paula J.A. et al. Colonic pro-

- teinases: increased activity in patients with ulcerative colitis // *Medicina*. – 1998. – Vol. 58. – P. 262–264.
22. *DeFea K.A., Zalevsky J., Thoma M.S.* et al. Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2 // *J. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 148. – P. 1267–1281.
23. *Harada N., Okajima K., Liu W.* et al. Activated neutrophils impair gastric cytoprotection role of neutrophil elastase // *Dig. Dis. Sci.* – 2000. – Vol. 45, N 6. – P. 1210–1216.
24. *Kanke T., Macfarlane S.R., Seatter M.J.* et al. Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes // *J. Biol. Chem.* – 2001. – N 18. – P. 18.
25. *Kawabata A., Kinoshita M., Nishikawa H.* et al. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 107. – P. 1443–1450.
26. *Kawao N., Sakaguchi Y., Tagome A.* et al. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the rat gastric mucosa: immunolocalization and facilitation of pepsin/pepsinogen secretion // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 135. – P. 1292–1296.
27. *Kotłowski R., Bernstein C.N., Silverberg M.S.* et al. Population-based case-control study of alpha 1-antitrypsin and SLC11A1 in Crohn's disease and ulcerative colitis // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2008. – Vol. 14, N 8. – P. 1112–1117.
28. *Ossovskaya V.S., Bunnett N.W.* Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease // *Physiol. Rev.* – 2004. – Vol. 84. – P. 579–621.
29. *Raithel M., Winterkamp S., Pacurar A.* et al. Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2001. – N 36. – P. 174–179.
30. *Yang P.C., Berin M.C., Yu L., Perdue M.H.* Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 158. – P. 681–690.