

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Кухарчук О.Л., Кузнецова О.В.

ВПЛИВ СПЛЕНЕКТОМІЇ НА ОБМЕЖЕНИЙ І НЕОБМЕЖЕНИЙ ПРОТЕОЛІЗ У ПЛАЗМІ КРОВІ І ТКАНИНАХ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ БІЛИХ ЩУРІВ

Буковинська державна медична академія

ВПЛИВ СПЛЕНЕКТОМІЇ НА ОБМЕЖЕНИЙ І НЕОБМЕЖЕНИЙ ПРОТЕОЛІЗ У ПЛАЗМІ КРОВІ І ТКАНИНАХ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ БІЛИХ ЩУРІВ – З метою визначення ролі селезінки в регуляції плазмового і тканинного протеолізу і фібринолізу проведені дослідження на спленектомованих самцях білих щурів. Встановлено, що спленектомія викликає активацію систем як необмеженого, так і обмеженого плазмового і тканинного протеолізу. У спленектомованих тварин на друге місце за активністю систем необмеженого протеолізу та фібринолізу виходить печінка – орган, який безпосередньо отримує кров з *vena lienalis*. Зроблено висновок про те, що селезінка продукує інгібітор протеїназ і ферментативного фібринолізу.

ВЛИЯНИЕ СПЛЕНЭКТОМИИ НА ОГРАНИЧЕННЫЙ И НЕОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ТКАНЯХ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ БЕЛЫХ КРЫС – С целью выяснения роли селезенки в регуляции плазменного и тканевого протеолиза и фибринолиза проведены исследования на спленектомизированных самцах белых крыс. Установлено, что спленектомия вызывает активацию систем как неограниченного, так и ограниченного плазменного и тканевого протеолиза. У спленектомизированных животных на второе место по активности систем неограниченного протеолиза и фибринолиза выходит печень – орган, который непосредственно получает кровь из *vena lienalis*. Сделан вывод, что селезенка продуцирует ингибитор протеиназ и ферментативного фибринолиза.

EFFECTS OF SPLENECTOMY ON THE LIMITED AND UNLIMITED PROTEOLYSIS IN THE BLOOD PLASMA AND TISSUE OF THE VISCERA OF ALBINO RATS. O.L. – In order to estimate the role of the spleen in the regulation of plasma and tissue proteolysis we have carried out experiments on splenectomized male albino rats. Splenectomy has been noticed to cause the activation of the systems of both unlimited and limited plasma and tissue proteolysis. The liver is said to forge to the second place in splenectomized rats according to the degree of activity of the systems of unlimited proteolysis and fibrinolysis, being the organ which receives blood directly from the *vena lienalis*. A conclusion is made to the effect that the spleen produces the inhibitor of proteinase and enzymatic fibrinolysis.

Ключові слова: селезінка, кров, тканини, фібриноліз, протеоліз.

Ключевые слова: селезенка, кровь, ткани, фибринолиз, протеолиз.

Key words: spleen, blood, tissues, fibrinolysis, proteolysis.

ВСТУП Протеолітичні ферменти відносяться до класу гідролаз, у складі якого розрізняють особливий підклас – пептидгідролази, що каталізують реакцію розщеплення пептидного зв'язку в білках і пептидах загального типу. Група пептидгідролаз, або протеїназ, складається з ферментів, які розщеплюють переважно внутрішні пептидні зв'язки в білках. Розрізняють загальний (необмежений) і обмежений протеоліз. При загальному протеолізі відбувається розщеплення поліпептидних ланцюжків молекули білка в багатьох локасах з утворенням низькомолекулярних продуктів, наприклад при впливі на білок пепсину, трипсину, хімотрипсину і комплексу бактеріальних протеїназ. При обмеженому протеолізі в білковій молекулі розриваються поодинокі пептидні зв'язки. При цьому молекула залишається білковою, але одержує нову функціональну якість, наприклад перетворення неактивної форми ферменту в активну: трипсиногену в трипсин, протромбін у тромбін, фібриногену у фібрин. Реакції обмеженого протеолізу є основою згортання крові і лізису тромбів, регуляції судинного тонуусу і кров'яного тиску, утворення низки білкових гормонів та інших біологічно активних пептидів [2].

Тканини організму захищені від дії протеїназ інгібіторами протеолізу. Співвідношення систем із взаємопротилежною дією знаходиться в суворій динамічній рівновазі, де кожній з них належить надзвичайно важлива роль у регуляції життєдіяльності організму. Інгібітори протеолізу виконують важливі фізіологічні функції, затримують передчасну активацію протеолітичних ферментів, захищають тканини від протеолізу мікробними ферментами, регулюють згортальну систему крові і фібриноліз, впливають на артеріальний тиск і проникність судин [1,6,7].

Мета роботи: визначити роль селезінки в регуляції інтенсивності протеолітичної і фібринолітичної активності плазми крові і тканин внутрішніх органів у білих щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Експерименти проведені на 20 самцях білих щурів масою тіла 0,15-0,17 кг. За асептичних умов під нембуталовим наркозом (40 мг/кг) проводили середню лапаротомію, перев'язували судини селезінки шовком і виконували спленектомію. Евтаназію тварин проводили через 2 тижні під нембуталовим наркозом. Для стабілізації крові застосовували 3,8 % розчин цитрату натрію (1:9). Тканини внутрішніх органів (тимус, надниркові залози, серце, легені, печінку, нирку і тонку кишку) одразу після декапітації щурів заморожували у рідкому азоті. Наважки тканин органів гомогенізували в 2,0 мл боратного буферу (рН 9.0) і використовували у біохімічному аналізі.

Визначення сумарного, ферментативного і неферментативного фібринолізу в плазмі крові і тканинах внутрішніх органів проводили за лізисом азофібрину ("Simko Ltd.", Україна). Принцип методу полягає в тому, що при інкубації азофібрину із стандартною кількістю плазміногену в присутності активаторів та інгібіторів фібринолізу, які містяться в плазмі крові або в тканинах, утворюється плазмін, активність якого оцінюється за ступенем забарвлення розчину в лужному середовищі в присутності ϵ -амінокапронової кислоти (неферментативний фібриноліз), або без неї (сумарна фібринолітична активність). Різниця між ними відповідає інтенсивності ферментативного фібринолізу [3].

За подібним методом визначали протеолітичну активність плазми крові і тканин внутрішніх органів, використовуючи азоальбумін, азоказеїн та азокол ("Simko Ltd.", Україна).

Статистична обробка отриманих даних проведена на 586 за допомогою "Excel-7". В таблицях значення "р" наведені лише для достовірних ($p=0,05$ або менше) різниць показників, що вивчалися.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Спленектомія призводила (табл. 1) до суттєвої активації плазмового протеолізу: лізис низькомолекулярних білків 4 збільшувався на 69,3 %, інтенсивність протеолітичної деградації високомолекулярних білків зростала в 2,1 раза, а колагеназа активність крові – на 70,0 %. Сумарна фібринолітична активність плазми крові підвищувалася на 95,6 % при переважному збільшенні інтенсивності ензиматичного лізису фібрину – в 2,3 раза, проте неферментативна фібринолітична активність також зростала (+66,7 %).

Отже, після спленектомії у тварин відбувається активація систем як необмеженого, так й обмеженого протеолізу з максимальним підвищенням інтенсивності лізису низькомолекулярних протеїнів та ензиматичної деградації фібрину.

Таблиця 2. Вплив спленектомії на інтенсивність тканинного протеолізу і фібринолізу у внутрішніх органах білих щурів (x±Sx)

Орган	Тимус		Надпиркові залози		Печінка		Серце		Легені		Нирки		Тонкий кишечник	
	К	Д	К	Д	К	Д	К	Д	К	Д	К	Д	К	Д
Серія Лізис азоальбуміну, E ₄₄₀ /Г/ год	15,26±	24,46±	65,48±	89,94±	21,75±	29,56±	14,79±	17,91±	14,35±	21,09±	18,09±	27,48±	15,66±	27,84±
	1,31	1,65	4,82	8,01	0,88	1,48	0,55	0,87	1,08	1,53	0,64	1,18	0,99	1,28
	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Лізис азоказеїну, E ₄₄₀ /Г/ год	21,02±	26,66±	58,40±	82,17±	21,39±	33,27±	15,23±	21,43±	15,33±	22,53±	18,63±	24,34±	17,63±	26,41±
	1,14	1,74	4,23	7,71	0,91	1,06	0,61	0,83	0,66	1,41	0,81	0,87	1,31	1,28
	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Лізис азоколу, E ₄₄₀ /Г/ год	11,38±	16,87±	64,66±	83,54±	12,27±	21,61±	7,68±	10,21±	6,96±	8,28±	7,02±	8,43±	9,43±	17,26±
	1,11	1,88	3,27	6,18	0,61	0,99	0,23	0,56	0,33	0,34	0,22	0,36	1,13	0,69
	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,001
Сумарна фібринолітична активність, E ₄₄₀ /Г/ год	13,35±	17,69±	55,86±	82,1±	12,03±	24,42±	8,56±	12,38±	9,59±	12,28±	8,61±	10,75±	12,82±	20,08±
	1,25	1,78	2,80	9,17	0,62	1,16	0,47	0,64	0,28	0,524	0,24	0,31	0,94	0,56
	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Неферментативна фібринолітична активність, E ₄₄₀ /Г/ год	6,85±	9,34±	28,17±	41,57±	6,01±	11,63±	4,62±	6,68±	4,76±	6,31±	4,29±	5,60±	7,15±	11,83±
	0,64	0,90	1,40	4,78	0,29	0,58	0,28	0,35	0,24	0,21	0,18	0,11	0,48	0,79
	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Ферментативна фібринолітична активність, E ₄₄₀ /Г/ год	6,51±	8,36±	27,73±	40,46±	5,95±	10,82±	3,95±	5,69±	4,75±	5,96±	4,33±	5,15±	5,94±	9,37±
	0,61	0,89	1,65	4,55	0,36	0,70	0,21	0,33	0,10	0,36	0,17	0,21	0,46	0,26
	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,001

Примітки. К – контроль (n=11); Д – дослід (n=9); p – ступінь достовірності різниць показників відносно контролю; n – кількість спостережень.

Таблиця 1. Вплив спленектомії на інтенсивність плазмового фібринолізу і протеолізу у білих щурів ($\bar{x} \pm Sx$)

Показники, що вивчалися	Контроль n=11	Дослід n=9
Лізіс азоальбуміну, E ₄₄₀ /мл/год	3,13±0,28	5,30±0,35 p<0,001
Лізіс азоказеїну, E ₄₄₀ /мл/год	2,08±0,06	4,30±0,19 p<0,001
Лізіс азоколу, E ₄₄₀ /мл/год	0,20±0,03	0,34±0,04 p<0,05
Сумарна фібринолітична активність, E ₄₄₀ /мл/год	0,45±0,03	0,88±0,08 p<0,001
Неферментативна фібринолітична активність, E ₄₄₀ /мл/год	0,24±0,01	0,40±0,03 p<0,001
Ферментативна фібринолітична активність, E ₄₄₀ /мл/год	0,21±0,02	0,48±0,06 p<0,001

Примітка. P – ступінь достовірності різниць показників, що вивчалися; n – кількість спостережень.

У інтактних щурів органи за інтенсивністю необмеженого і обмеженого протеолізу розподілялися наступним чином (табл. 2):

- лізіс азоальбуміну: надниркові залози > печінка > нирки > тонкий кишечник = тимус = серце = легені;
- лізіс азоказеїну: надниркові залози > тимус = печінка > нирки = тонкий кишечник > серце = легені,
- лізіс азоколу: надниркові залози > тимус = печінка > тонкий кишечник > серце > нирки = легені;
- сумарний фібриноліз: надниркові залози > тимус = тонкий кишечник = печінка > серце = легені = нирки;
- неферментативний фібриноліз: надниркові залози > тонкий кишечник > тимус > печінка > серце = легені = нирки;
- ферментативний фібриноліз: надниркові залози > тимус = тонкий кишечник = печінка > серце = легені = нирки.

Спленектомія підвищувала протеолітичну активність у всіх органах (лізіс азоальбуміну зростав від 21,1 до 77,8 %, лізіс азоказеїну – від 26,8 до 55,5 %, лізіс азоколу – від 19,0 до 83 %), збільшувалась інтенсивність тканинного фібринолізу (сумарна фібринолітична активність зростала від 24,9 до 103,0 %, неферментативна – від 30,5 до 93,5 %, ферментативна – від 18,9 до 81,8 %) і змінювала розподіл органів за інтенсивністю тканинного протеолізу і фібринолізу:

- лізіс азоальбуміну: надниркові залози > печінка = нирки = тонкий кишечник > тимус > легені > серце;
- лізіс азоказеїну: надниркові залози > печінка > тимус = тонкий кишечник > нирки = серце = легені;
- лізіс азоколу: надниркові залози > печінка > тимус = тонкий кишечник > серце > легені = нирки;
- сумарний фібриноліз: надниркові залози > печінка > тонкий кишечник > тимус > серце = легені > нирки;
- неферментативний фібриноліз: надниркові залози > печінка = тонкий кишечник > тимус > серце = легені > нирки;
- ферментативний фібриноліз: надниркові залози > печінка = тонкий кишечник > тимус > серце = легені > нирки.

Отже, після спленектомії друге місце за активністю системи необмеженого протеолізу та фібринолізу займає печінка – орган, який безпосередньо отримує кров з vena lienalis. Цей факт, в поєднанні з генералізованим підвищенням плазмового і тканинного необмеженого та обмеженого протеолізу, зас-

відчує, що селезінка або продукує інгібітор протеїназ, або гальмує печінковий синтез інгібіторів протеолізу.

На користь першого припущення свідчать дані [6,7] про те, що білковий низькомолекулярний екстракт селезінки пригнічує неферментативний фібриноліз. Проте, за нашими даними, спленектомія зменшує не лише неферментативну фібринолітичну активність тканин внутрішніх органів, але й знижує інтенсивність необмеженого протеолізу та ензиматичного лізису фібрину.

Лікувальна дія інгібіторів протеїназ широко застосовується в терапії гострих запальних процесів, при порушеннях у системі регуляції агрегатного стану, шоківих станах, у комплексному лікуванні панкреатиту (гострого і хронічного), в стоматології та інших галузях медицини [6,7]. Отримані дані свідчать про доцільність подальших досліджень щодо визначення природи спленального фактора, що гальмує протеоліз, та впливу на активність протеолітичних ферментів спленіну.

ВИСНОВОК У спленектомованих щурів відбувається тотальна активація обмеженого і необмеженого протеолізу у тканинах внутрішніх органів (тимус, надниркові залози, печінка, легені, серце, нирки, тонка кишка), що свідчить про наявність у селезінці інгібітора(ів) протеїназ і ферментативного фібринолізу.

1. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме й при патологии. – К.: Здоров'я, 1993. – 277с.
2. Даниличев В.Ф. Патология глаз. Ферменты й ингибиторы. – СПб.: Стройлеспечать. – 1996. – 240 с.
3. Кухарчук О.Л. Патогенетична роль та методи корекції інтегративних порушень гормонально-месенджерних систем регуляції гомеостазу натрію при патології нирок: Автореф. дис... д-ра мед. наук: 14.03.05 / Одеський мед. ін-т. – Одеса, 1996. – 37 с.
4. Ляпина Л.А., Азиева Л.Л. Физиологические свойства белкового фактора, выделенного из ткани селезенки крыс // Физиол. журн. – 1985. – Т.71, №7. – С.910-920.
5. Ляпина Л.А., Агеева Т.К. Система гемостаза при введении экстракта селезенки й комплекса его с гепарином // Гематол. й трансфузиол. – 1988. – Т.33, № 7. – С.33-36.
6. Руденко В.Г., Руденко Ю.В. Протеиназы, ингибиторы протеиназ и противоревматическая терапия // Ревматология. – 1990. – № 3. – С.32-38.
7. Руденко В.Г., Руденко Ю.В. Протеолитические ферменты и их ингибиторы при артритах // Ревматология. – 1990. – № 4. – С.42-49.