

*В.Н. Гапанович, Е.Д. Расюк, Г.Н. Бычко*

## **Антиферментный препарат овомин: целевые свойства в условиях экспериментального трипсинового шока**

*ГУ “НИИ гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Беларусь”*

Изучено влияние антиферментного препарата овомин на восстановление биохимических показателей крови, нарушенных в ходе развития трипсинового шока у собак. Показано, что овомин, получаемый на основе овомукоида, выделяемого из белка утиных яиц, является эффективным ингибитором протеиназ. Введение овомина на высоте развития шокового состояния приводит к нормализации показателей протеинового обмена, баланса в системе протеиназы-ингибиторы протеиназ плазмы крови, оказывает положительное влияние в целом на выживаемость животных вследствие эффективного ингибирования избытка протеолитической активности сериновых протеиназ и блокирования развития системных негативных патофизиологических эффектов протеаземии, что подтверждает высокую лечебную эффективность разработанной инъекционной формы антипротеиназного средства. Ключевые слова: овомин, протеолитическая активность, сериновые протеиназы, трипсиновый шок.

V.N. Gapanovich, E.D. Rasyuk, G.N. Bychko

Anti-enzymatic drug ovomin: principal properties in experimental trypsin shock model  
The influence of anti-enzymatic drug ovomin on the recovery of the disturbed during the experimental trypsin shock in dogs biochemical blood parameters has been studied. Ovomin manufactured on the base of the protein ovomucoid isolating from the duck eggs has been shown to be an effective proteinase inhibitor. Ovomin administration on the elevation of the shock development resulted in normalization of protein metabolism and proteinase-inhibitor of proteinase balance, influenced positively on surviving rate of experimental animals as a result of effective inhibition of serine proteinases excess proteolytic activity and prohibition of systemic negative pathophysiological effect development of proteasemia, that proves high therapeutic effectiveness of developed injection form of anti-enzymatic drug ovomin.

Key words: ovomin, proteolytic activity, serine proteinases, trypsin shock

При развитии критических состояний, сопровождающихся синдромом эндогенной интоксикации (ЭИ) – шок различного генеза, ожоговая травма, обширные гнойно-септические заболевания, массивные хирургические вмешательства и др., отмечается выраженное и стойкое рассогласование в системе протеиназы-ингибиторы протеиназ плазмы крови.

Синдром ЭИ – типовой динамически развивающийся патологический процесс, начинающийся с метаболических сдвигов, что приводит к расстройству физиологических функций различных систем организма, а затем и к их нарушению, и завершается полиорганной недостаточностью с повреждениями, зачастую несовместимыми с жизнью (печеночная недостаточность, нефропатия и энцефалопатия, иммунодепрессия, нарушения гемодинамики) [16].

Именно гиперактивация протеолитических систем организма на фоне редукции ингибиторного потенциала расценивается большинством исследователей в качестве одного из ключевых патогенетических звеньев эндогенной интоксикации [19].

В комплексной терапии ЭИ при критических состояниях используется весь арсенал эфферентных методов детоксикации и гемокоррекции (гемосорбция, гемофильтрация, гемодиализ, плазмадиализ, плазмаферез и др.). Вместе с тем, большинство специалистов практически едины во мнении о том, что своевременно проведенное консервативное лечение с использованием антипротеиназных средств должно являться начальным этапом медикаментозной коррекции эндогенного токсикоза, поскольку является патогенетически более ранним элементом протокольной терапии гиперпротеиназемии.

Наиболее широко применяемые на сегодняшний день атиферментные средства по физико-химическим характеристикам схожи с панкреатическим ингибитором Кунитца-Нортропа ( $M_w$  около 6500), имеющего один активный центр, связывающий сериновые протеиназы – трипсин, химотрипсин, калликреин или тромбин. Ингибитор, выделяемый из поджелудочной или околоушной желез животных, является основой таких известных препаратов как контрикал (Германия), тсалол, тразилол (Швейцария), гордокс (Венгрия).

Указанные фармсредства вводятся внутривенно и внутривентриально, однако благодаря высокой основности и невысокой молекулярной массе производные ингибитора Кунитца эффективно сорбируются почечной мембраной и быстро выводятся из организма. В связи с этим, для достижения терапевтической концентрации ингибитора в крови необходимо его частое введение, на практике – в течение нескольких часов в составе параллельно проводимой инфузионной терапии, что обременительно в первую очередь для больного. Кроме того, эти препараты не подавляют активность лейкоцитарных катепсинов, панкреатической эластазы и ряда бактериальных протеиназ, играющих ключевую роль в развитии системных расстройств при критических и терминальных состояниях. Следует отметить, что практическое использование приведенных выше препаратов существенно ограничено из-за отсутствия собственного производства, высокой стоимости и зависимости закупок по импорту.

Основываясь на фундаментальных исследованиях в области изучения свойств протеиназ растений и животных [8, 9], ученым НИИ гематологии и переливания крови (лаборатория экспериментальной патологии и трансфузиологии) удалось разработать технологию получения готовой лекарственной формы нового антиферментного средства овомин, внедрить ее в промышленное производство и клиническую медицину. Развитие этой технологии применительно к условиям ОАО “Белмедпрепараты” позволило приступить к серийному выпуску нового лекарственного средства.

Субстанция овомина ( $M_w$  около 31000) обладает ярко выраженными ингибиторными свойствами и высокой антипротеиназной емкостью по отношению к сериновым протеиназам, поскольку одна молекула овомукоида способна одновременно нейтрализовать две молекулы трипсина, одну молекулу химотрипсина и одну молекулу эластазы с образованием устойчивого комплекса. Подобная особенность физико-химических свойств делает овомин эффективным поливалентным корректором гиперферментемии, оказывающим нормализующее

действие на дисбаланс в системе протеиназы-ингибиторы, благодаря способности подавлять активность лейкоцитарных эластазы и катепсина G, а также панкреатической эластазы и некоторых трипсиноподобных нейтральных энзимов бактериального происхождения. Более высокая средневесовая молекулярная масса овомукоида по сравнению с ингибитором Кунитца-Норттропа способствуют выведению овомина из организма с меньшей скоростью: период полувыведения составляет чуть более 4 часов, что позволяет назначать препарат болюсно, эффективно поддерживая его терапевтическую концентрацию в крови. Данная работа является частью комплексного изучения медико-биологических свойств инъекционной формы антипротеиназного препарата овомин доклинического этапа [3-5, 11-14] и посвящена оценке целевых специфических фармакотерапевтических свойств разработанного препарата в условиях трипсинового шока у собак. Моделируемая в эксперименте патология по специфичности своего проявления и основным механизмам развития должна быть максимально приближена к реальным клиническим ситуациям. Только при этом условии становится возможным и оправданным перенос выявленных особенностей и закономерностей патогенеза той или иной нозологической формы заболевания, в равной мере, как и эффективности разрабатываемых методов коррекции, вопросов детализации лечебной тактики на конкретные аспекты практической медицины. Так, используемая в работе, экспериментальная модель гиперпротеаземии близка к той реальной клинической ситуации, которая манифестируется при панкреатите (любой этиологии), сепсисе, перитоните и ряде других критических состояний организма, при которых отмечается резкий выброс в циркуляцию тканевых сериновых протеиназ (с последующей каскадной активацией собственных протеолитических систем крови), позволяла, на наш взгляд, проследить антипротеиназное действие овомина и наметить подходы к последующему практическому использованию препарата.

#### Материалы и методы

Опыты поставлены на беспородных собаках обоего пола 3-6 лет и массой тела 15-23 кг, находящихся на стандартном пищевом рационе вивария.

Для воспроизведения гиперпротеаземии в “чистом виде” использовалась видоизмененная модель трипсинового шока [1, 7]. Очищенный препарат кристаллического трипсина (“СПОФА”, ЧССР) растворяли в физиологическом растворе и вводили в одну из периферических вен конечности из расчета 50 мг/кг веса животного.

Экспериментальные животные были разделены на 3 серии: две контрольные и одну опытную. В первой контрольной серии (n = 6) никакой медикаментозной коррекции возникающих после введения трипсина расстройств гомеостаза не проводилась. В целях более полного представления об ингибиторной активности препарата в реальных условиях эксперимента – стабильности образующегося комплекса протеиназа-ингибитор в организме, а также оценки эффективности его использования, во второй контрольной серии (n = 3) были поставлены опыты по внутривенному введению на фоне трипсинового шока комбинации предварительно проинкубированных растворов трипсина и овомина (время инкубации – 30 мин). Третью, опытную серию (n = 5) составляли животные, которым на 30 минуте после введения трипсина внутривенно вводили расчетное

количество овомина. Активность используемого антипротеиназного препарата составляла не менее 2500 АтрЕ/мг гликопротеина. Взятие крови для исследования осуществлялось на высоте развития трипсинового шока, через 30, 60, 120 минут после введения трипсина (или сразу после инфузии овомина, спустя 30 и 90 минут, соответственно), затем – на 1, 3, 7, 10, 15 и 20 сутки эксперимента.

При подборе аналитических методов исследования основывались на важности комплексного подхода к оценке метаболизма белков и активации протеолитических систем плазмы крови, как основного элемента генерализации ЭИ. Определение биохимических параметров протеинового баланса определяли по [17, 20], в т.ч. содержание среднемолекулярных пептидов (СМ) – по [10], часть исследований по количественному содержанию СМ в образцах плазмы крови и определению их фракционного состава было проведено методом гельпроникающей хроматографии на сефадексе G-50 (“Фармация”, Швеция) [2], концентрация мочевины регистрировалась с использованием реагентов фирмы “Lacema” (Чехия), состояние системы протеиназы-ингибиторы протеиназ – по [6, 18].

Полученные результаты верифицированы и подвергнуты стандартным приемам статистической обработки [15].

Результаты и обсуждение

Основные закономерности нарушений белкового метаболизма в ходе развития экспериментальной трипсинемии, зарегистрированные в ходе проведенного исследования, сводятся к следующему.

Внутривенное введение трипсина уже через 5 минут вызывало скачкообразное повышение протеолитической активности плазмы, достигающее 440%. Развитие протеаземии проходило на фоне подавления почти в 1,5 раза ингибиторного потенциала  $\alpha$ 1-антитрипсина ( $\alpha$ 1-АТ). И хотя активность другого важнейшего естественного ингибитора протеиназ –  $\alpha$ 2-макроглобулина ( $\alpha$ 2-МГ) в этот временной интервал несколько возрастала, этого было недостаточно для предотвращения деструктивной роли развивающейся гиперферментемии. В процессе развития шока (30-90 мин эксперимента) состояние животных прогрессирующе ухудшалось, что проходило на фоне достаточно высоких значений протеолитической активности плазмы (Рис.1, Б).

Отмеченный дисбаланс в системе протеиназы-ингибиторы приводил к биодеструкции плазменных белков крови и накоплению токсических продуктов их неполной деградации – СМ, являющихся общепризнанными маркерами тяжести эндогенной интоксикации. Так, через 5 минут после введения трипсина регистрировалось снижение общего белка и альбумина до 80,9% и 65,7% от первоначальных значений, соответственно. Параллельно отмечался резкий рост содержания СМ – до 319% и мочевины – до 159,7% от их изначальных величин (Рис.1, А). При гель-хроматографическом анализе области выхода СМ было отмечено, что введение трипсина вызывало ее резкое расширение с утратой симметричности пика и его смещением в область низких молекулярных масс, появлением дополнительных пиков в области выхода аминокислот. В дальнейшем негативная динамика изменений большинства исследуемых показателей прогрессивно нарастала вплоть до гибели животных, наступавшей через 1,5 - 18 часов после введения трипсина.

Таким образом, полученные в первой контрольной серии экспериментов результаты указывали на то, что самостоятельный выход животных из сложившейся терминальной ситуации невозможен.

Тем не менее, прежде чем приступить непосредственно к исследованию эффективности корректирующего действия разработанного антипротеиназного препарата на течение трипсинового шока, казалось оправданным проведение экспериментов с одновременным введением комбинации трипсина и овомина. Оказалось, что при введении предварительно проинкубированных трипсина и изучаемого ингибитора у экспериментальных животных (2 контрольная серия) практически полностью нивелировалось развитие столь характерной для предыдущей серии картины трипсинового шока. Следует отметить, что сразу после инъекции композиции протеиназа-ингибитор, содержание общего белка и альбумина в плазме крови снижалось до 90,1% и 91,2%, соответственно, несколько возрастал уровень СМ и мочевины (Рис.1, В). Определение протеолитической активности показало ее двукратное увеличение по сравнению с исходными данными (Рис.1, Г). Однако, уже к 30 минуте эксперимента концентрация общего белка и альбумина возвращалась к исходным величинам, а уровень СМ и протеолитической активности стабилизировались, тогда как содержание мочевины с 30 минуты превышало начальные величины незначительно. Подобная динамика сдвигов показателей белкового обмена в период, соответствующий у собак первой контрольной серии максимальной реализации проявлений трипсинового шока, свидетельствовала о достаточно эффективном блокировании протеолитических свойств трипсина разработанной лекарственной формой овомина. В последующие 1,5 часа эксперимента содержание общего белка и альбумина не отличалось от исходных данных, регистрировалось значительное снижение количества СМ и уровня протеолитической активности, хотя последние параметры все еще оставались повышенными (195,9% и 147,1%, соответственно). Тем не менее, спустя 1 сутки эксперимента и вплоть до окончания периода наблюдений (20 сутки) содержание СМ и уровень протеолитической активности достоверно не отличались от нормы. Таким образом, одновременное введение предварительно проинкубированных трипсина и антипротеиназного средства овомин эффективно предотвращало развитие негативных проявлений трипсинового шока, демонстрировало отсутствие отдаленных отрицательных последствий трипсинемии, указывает как на высокую специфичность препарата, так и на прочность комплекса протеиназа-ингибитор.

Для непосредственной оценки лечебной эффективности антиферментных свойств овомина в опытной серии животных спустя 30 минут после введения трипсина осуществлялась коррекция гиперпротеаземии разработанным препаратом. Динамика развития трипсинового шока в начальные 30 минут эксперимента (период введения трипсина) по всем регистрируемым показателям совпадала с таковой в первой контрольной серии. Следует отметить, что уже к окончанию процесса коррекции (60 минут эксперимента) регистрировалось значительное улучшение показателей, иллюстрирующих силу развития дисбаланса в системе протеиназы-ингибиторы протеиназ – содержания СМ и протеолитической активности (Рис.1, Д, С): концентрация первых снизилась в 1,7 раза, а второй – в 2 раза по сравнению с максимальными значениями, регистрируемыми на 5

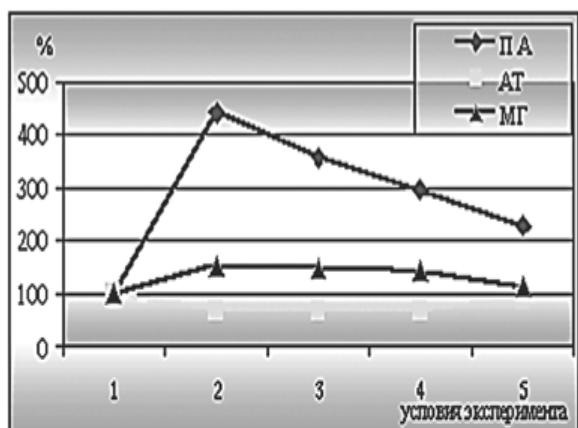
минуте эксперимента. Через 1 час после введения овомина содержание общего белка и альбумина стабилизировались на фоне дальнейшего снижения уровня СМ (до 184,5%) и постоянных значений протеолитической активности (159,6%). Эффективное уменьшение продуктов незавершенного протеолиза в плазме крови на протяжении часа от окончания введения овомина может быть обусловлено несколькими факторами:

- прямым ингибированием разработанным препаратом остаточной активности введенного трипсина, а также собственных протеиназных систем организма, и предотвращением, таким образом, дальнейшей биодеструкции плазменных и тканевых белков;
- нормализацией сосудистой проницаемости и улучшением микроциркуляции в терминальном отделе сосудистого русла, уменьшением гипоксии органов и тканей и, как следствие, снижением локальной наработки “средних молекул” тканевыми и клеточными протеиназами; уменьшением поступления последних в системную циркуляцию;
- нормализацией функционирования органов естественной депурации организма, прежде всего печени и почек.

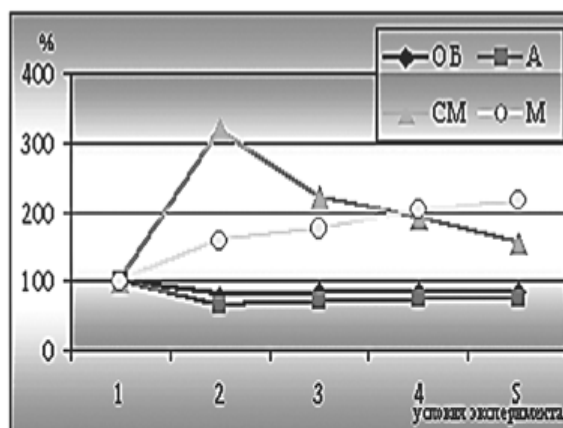
Начиная с 1 суток и до окончания наблюдения за животными опытной серии, содержание в плазме крови собак общего белка, альбумина и уровень протеолитической активности практически не отличались от показателей условной нормы. Концентрация СМ и мочевины снизилась до исходного уровня к 7-10 суткам эксперимента. По данным молекулярно-массового распределения белковых фрагментов к этому периоду практически восстанавливалась исходная зона выхода СМ, что свидетельствовало не только об ингибировании исследуемым препаратом активности экзогенного трипсина, но и о нормализации уровня активности эндопептидаз и экзопептидаз, включающихся в процессы утилизации пептидов.

Таким образом, применение исследуемого препарата овомин в качестве базового корректирующего средства при экспериментальной трипсинемии на высоте развития шокового состояния, в короткие сроки нормализовало баланс в системе протеиназы-ингибиторы протеиназ плазмы крови (и, очевидно, с учетом Mw овомукоида – интерстициального сектора), что является следствием эффективного ингибирования избытка протеолитической активности сериновых протеиназ и блокирования “запускаемых” ими негативных системных патофизиологических эффектов, что подтверждает высокую лечебную эффективность инъекционной формы нового антипротеиназного средства.

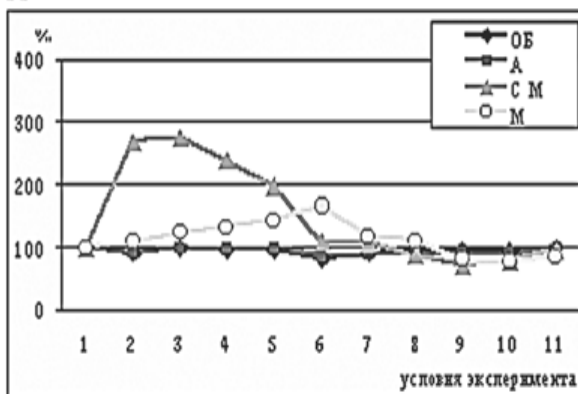
Следует особенно отметить, что антипротеиназый препарат овомин, предназначенный для парентерального введения, благодаря своим уникальным физико-химическим и медико-биологическим особенностям обладает поливалентной активностью по отношению к сериновым панкреатическим и лейкоцитарным протеиназам, имеет достаточную степень чистоты и не содержит балластных примесей, высокую стабильность в процессе хранения и оптимальные фармакокинетические, фармакодинамические и фармакоэкономические характеристики вошел в “Республиканский перечень основных лекарственных средств и изделий медицинского назначения”.



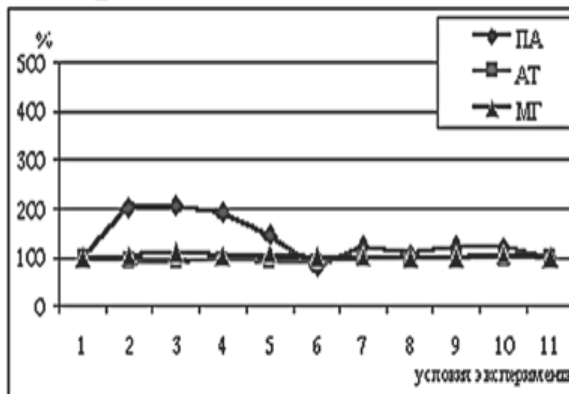
А



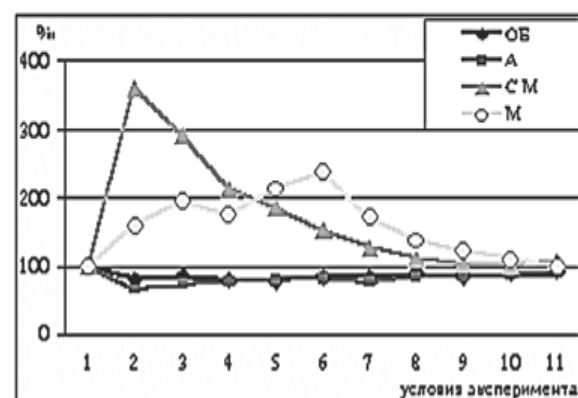
Б



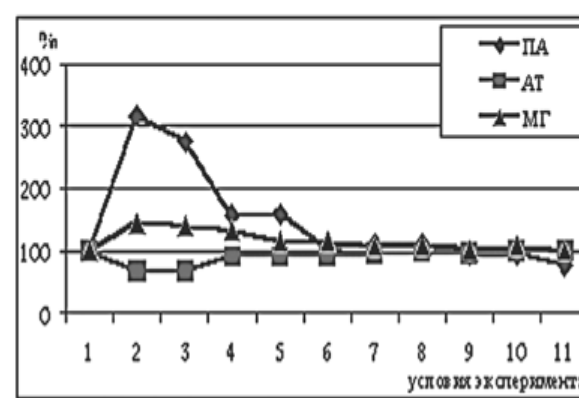
В



Г



Д



Е

Рис.1 Направленность сдвигов некоторых показателей протеинового обмена (общий белок – ОБ, альбумин – А, среднемoleкулярные пептиды – СМ, мочеви́на – М; протеолитическая активность – ПА,  $\alpha$ 1-антитрипсина – АТ и  $\alpha$ 2-макроглобулина – МГ в первой (А, Б) и второй (В, Г) контрольных, а также опытной (Е, Д) сериях животных.

Обозначения: 1 - исходные данные; 2 и 3 – через 5 и 30 минут после введения трипсина; 4 и 5 – через 60, 120 минут после введения трипсина, или 30, 90 минут после введения овомина, соответственно; 6, 7, 8, 9, 10 – на 1, 3, 7, 10, 15 и 20 сутки эксперимента, соответственно.

## Литература

1. Белова Т.А., Хватов В.Б. Моделирование протеолиза для обоснования целенаправленной терапии антипротеиназными средствами // Пат. физиол. и эксперим. терапия. - 1986. - №3. - С. 27-29.
2. Детерман Г. Гель-хроматография. - М.: Мир, 1970. - 252 с.
3. Гапанович В.Н., Петров П.Т., Расюк Е.Д., Царенков В.М., Валуева Т.А., Валуев Л.И., Лисовая И.А., Степанюга В.Г. Антиферментный препарата “Овомин”; медико-биологические свойства // Тез. докл. III Всероссийского съезда гематологов и трансфузиологов “Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии” (Санкт-Петербург, 26–28 ноября, 1996 г.). – Санкт-Петербург. – 1996. – С. 98.
4. Гапанович В.Н., Расюк Е.Д., Валуева Т.А., Иванов Е.П., Илюкевич Г.В., Валуев Л.И., Лисовая И.А., Бычко Г.Н., Прокосенко Е.А. Новый антиферментный препарат овомин. Медико-биологические свойства и лечебная эффективность. // Тез. докл. научно-практической конференции “Актуальные проблемы практической и клинической трансфузиологии” (Душанбе, 27-29 апреля 1997 г.). – Душанбе, 1997. – С. 147-148.
5. Гапанович В.Н., Расюк Е.Д., Бордаков В.Н. Разработка и клиническое применение нового антипротеиназного препарата овомин // Сб. научн. и научно-практических работ профессорско-препод. состава военно-медицинского факультета врачей/ Под ред. С.Г. Гусева – Мн.: МГМИ, 2000. – С. 31-35.
6. Карягина И.Ю., Зарембский Р.А., Балябина М.Д. Использование метода комплексного определения активности трипсинподобных протеиназ ?1-антитрипсина и ?2-макро-глобулина в гастроэнтерологической клинике // Лаб. дело. - 1990. - № 2. - С. 10-13.
7. Мешалкин Е.И., Сергиевский В.С., Сувернев А.В. Трипсинемия в реакциях организма на повреждение. - Новосибирск: Наука, 1982. - 73 с.
8. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М.: Наука. – 1971. – 404 с.
9. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. Москва, Институт биохимии им. Баха РАН. – 1993. – 207 с.
10. Николайчик В.В., Кирковский В.В., Моин В.М., Лобачева Г.А. и др. Определение средних молекул методом кислотно-этанольного осаждения // Лаб. дело. - 1989. - № 6. - С. 31-33.
11. Патент Российской Федерации № 2053789 от 10.02.1996 г. (приоритет от 02.08.1993 г.) Валуева Т.А., Гапанович В.Н., Петров П.Т., Валуев Л.И., Платэ Н.А., Царенков В.М., Матвеева Н.В., Расюк Е.Д.
12. Расюк Е.Д., Гапанович В.Н., Валуева Т.А., Петров П.Т., Валуев Л.И., Иванов Е.П., Платэ Н.А., Ткачев А.В., Лисовая И.А., Бычко Г.Н. Медико-биологические свойства ингибитора протеиназ овомин // Тез. докл. V Российского национального конгресса “Человек и лекарство” (Москва, 21-25 апреля 1998 г.). – Москва, 1998. – С. 520.
13. Расюк Е.Д., Гапанович В.Н., Куцук О.К., Валуева Т.А., Ткачев А.В., Валуев Л.И., Чехольский А.С. Влияние антиферментного препарата “Овомин” на гемостазиологические и микрогемореологические свойства крови // Матер. III-й Белорусской научно-практической конференции “Эфферентные и физико-



химические методы терапии” (Могилев, 23-25 сентября 1998 г.). – Могилев, 1998. – С. 175-178.

14. Расюк Е.Д., Ткачев А.В., Изучение влияния ингибитора протеиназ овомин на показатели белкового обмена в эксперименте // Молодые ученые – медицине XXI века: Мат. Международной научно-практической конф. Молодых ученых и студентов Гродненского государственного медицинского университета. – Гродно, 2001. – Ч. 1. – С. 131-134.

15. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. - Минск, 1973. - С. 80-100, 297.

16. Уманский М.А., Пинчук Л.Б., Пинчук Н.А. Синдром эндогенной интоксикации. - Киев, 1979. - С. 77-80.

17. Daumas B.T., Watson W.A. Determination of serum albumin by the manual bromocresol-green method // Clin. Acta. - 1971. - V.31. - №1. - P. 87-96.

18. Kakade M.I., Simons N., Liener G.E. // Cereal.Chem. - 1969. - Vol. 46. - P. 518-526.

19. Pathobiology of sepsis: role of proteinases, proteinase inhibitors and oxidizing agents / Jochum M., Witte J., Dusvald D. et al. // Behring Inst. Mitt. - 1986 - Vol. 79. - P. 121 - 130

20. Solo E.Y., Honkavaara E.Y. A linear single reagent method for determination of protein in cerebrospinal fluid // Scand. Y. Clin. Lab. Invest. - 1974. - V. 34. - P. 283-284.