

І. М. Трофимова, В. Є. Досенко, Ю. В. Биць

Активність еластази та її інгібіторів у тканинах аорти та сироватці крові при різних видах ацидозу

При моделировании различных видов ацидоза (гиперхлоремического, молочнокислого и кетоацидоза при голодании) у крыс изучалась активность эластазы, содержание α_2 -макроглобулина (α_2 -М) и α_1 -ингибитора протеиназ (α_1 -ИП) в тканях аорты и сыворотке крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень нарушений в системе эластаза - ингибиторы зависит от выраженности изменений в системе регуляции кислотно-основного состояния. В аорте при моделировании различных видов ацидоза коэффициент ингибиторы/эластаза снижается вследствие уменьшения содержания α_2 -М - при гиперхлоремическом ацидозе, повышения активности эластазы - при лактат-ацидозе, увеличения активности эластазы и уменьшения содержания α_2 -М при кетоацидозе. В сыворотке крови аналогичный коэффициент снижается вследствие повышения активности эластазы и уменьшения содержания α_2 -М при гиперхлоремическом ацидозе и голодании, либо за счёт уменьшения содержания α_2 -М при лактат-ацидозе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что одним из механизмов повреждения сосудистой стенки при ацидозе является нарушение баланса между эластазой и её ингибиторами в тканях артерий.

ВСТУП

Відомо, що активність переважної більшості ферментів залежить від рівня рН. З іншого боку, при порушенні кислотно-лужної рівноваги можуть відбуватися зміни у секретії певних ферментів, оскільки рівень рН у біологічному середовищі суттєво впливає і на інтенсивність їх продукції та подальшого вивільнення. Більше того, рівень позаклітинного рН може бути фактором, що регулює синтез внутрішньоклітинних ферментів [11, 19]. Особливий інтерес представляє вивчення активності протеолітичних ферментів та їх природних інгібіторів при різних видах ацидозу. Крім того, що протеїнази беруть участь у деградації позаклітинних білків, вони виконують важливі регуляторні функції в організмі. Шляхом обмеженого протеолізу утворюються та інактивуються різноманітні біологічно активні речовини (ангіотензини, брадикінін, білки системи комплементу), що

безпосередньо впливають на функціональну активність органів (нирки, легені), які підтримують кислотно-лужну рівновагу [2]. Доведено також, що при метаболічному ацидозі відбувається активація убіквітинзалежного протеасомального протеолізу [7, 18] - внутрішньоклітинної системи регуляції активності транскрипції генів, посттрансляційного процесінгу білків та деградації цитоплазматичних і мембранних протеїнів. Припускається існування взаємозв'язку позаклітинних протеолітичних ферментів і внутрішньоклітинних протеолітичних систем. Зокрема, активована форма α_2 -макроглобуліну - α_2 -М - (один з білків-інгібіторів еластази), зв'язуючись з відповідним рецептором на поверхні клітини, може здійснювати перенос протеїназ у внутрішньоклітинний простір, де вони здатні відновлювати свою активність [16].

Інтерес представляє вивчення протеолізу при порушеннях кислотно-лужної рівноваги в зв'язку і з судинною патологією, вра-

ховуючи актуальність її медико-соціальних і теоретичних аспектів. У наших попередніх дослідженнях було показано, що порушення балансу між еластазою та її інгібіторами в тканинах аорти відбувається на ранніх стадіях артеріоатеросклерозу [1, 3]. З іншого боку, є відомості, що у разі патологічних станів, які призводять до ацидозу (цукровий діабет, нефротичний синдром, хронічна ниркова недостатність), зростає ймовірність розвитку уражень судин атеро- або артеріосклеротичного характеру [10, 20, 21].

Мета нашої роботи полягала у з'ясуванні зв'язку між активністю еластази та її інгібіторів та порушеннями кислотно-лужної рівноваги при моделюванні різних видів ацидозу.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на 157 статевозрілих щурах масою $173,75 \text{ г} \pm 35,95 \text{ г}$. У дослідних тварин моделювали негазовий гіперхлоремічний ацидоз введенням $20 \text{ ммоль NH}_4\text{Cl}$ на 1 кг маси тіла; молочнокислий ацидоз - 20 ммоль молочної кислоти на 1 кг маси тіла [6]; метаболічний кетоацидоз при голодуванні протягом однієї та трьох діб за умов підтримання нормального питного режиму. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 1 год після введення NH_4Cl чи молочної кислоти, через одну та три доби голодування. Тканини аорти готували для біохімічного дослідження [3]. Сироватку крові отримували центрифугуванням при 3000 об/хв (900g) упродовж 15 хв .

Активність еластази вивчали за гідролізом специфічного хромогенного субстрату $\text{Suc}(\text{Ala})_3\text{-p-NA}$ та виражали в мікромолях p-NA за 1 год на 1 г білка в тканинах судин та в мікромолях p-NA за 1 год в 1 л у сироватці крові. Вміст $\alpha_2\text{-M}$ та α_1 -інгібітора протеїназ ($\alpha_1\text{-III}$) визначали з використанням $\text{N-бензоїл-DL-аргінін-p-NA}$ (БАПНА) [2]. Вміст білка в гомогенатах тканин визначали за методом Lowry [14].

Визначали загальноприйняті показники кислотно-лужної рівноваги: від'ємний логарифм концентрації іонів водню (pH), парціальний тиск кисню (pO_2), парціальний тиск вуглекислого газу (pCO_2), вміст гідрокарбонату крові (HCO_3^-), загальну кількість вуглекислого газу (TCO_2) та зсув буферних основ (BE) за допомогою газового аналізатора OP-215 (фірма "Radelkis", Угорщина).

Отримані результати обробляли математично на ПК $\text{IBM AMD } 5\text{x}86$ з використанням програм $\text{Sigma Plot } 5.0$, $\text{Excel } 97$; вірогідність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для оцінки ступеня важкості порушень, які виникали при моделюванні різних видів ацидозу в першу чергу нами було проаналізовано показники кислотно-лужної рівноваги (табл. 1). Результати дослідів свідчать про розвиток декомпенсованого ацидозу при введенні NH_4Cl (значне зниження pH , зменшення вмісту загального гідрокарбонату та від'ємне значення показника BE), компенсованого ацидозу при введенні молочної кислоти та голодуванні протягом трьох діб (неістотне зниження pH крові поряд зі змінами в TCO_2 , HCO_3^- та BE) та тенденцію до розвитку метаболічного кетоацидозу при голодуванні протягом однієї доби (вірогідне зменшення вмісту гідрокарбонату, TCO_2 та BE) [4, 5].

Активність еластази вірогідно підвищується у середньому в три рази при моделюванні всіх видів ацидозу, крім гіперхлоремічного (табл. 2). Вміст $\alpha_2\text{-M}$ при різних видах ацидозу має тенденцію до зменшення у разі молочнокислого ацидозу та однодобового голодування, а при гіперхлоремічному ацидозі та голодуванні протягом трьох діб спостерігається вірогідне зменшення цього інгібітора у $3,4$ та $2,7$ рази відповідно. Дещо по-іншому змінюється вміст $\alpha_1\text{-III}$: вірогідно підвищується при молочнокислому ацидозі та при голодуванні протягом однієї доби і становить $8,07 \pm 0,24$ та $4,26 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ білка $\pm 0,99 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ білка відповідно (в контролі $2,33 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ білка $\pm 0,29 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ білка). Внаслідок цих змін

Таблиця 1. Показники кислотно-лужної рівноваги крові щурів за умов моделювання ацидозу

Схема досліджу	pH	PO ₂	pCO ₂	Загальна кількість CO ₂	HCO ₃ ⁻	Зсув буферних основ (BE)
Контроль (n=25)	7,40±0,02	55,8±8,64	33,6±5,87	32,3±2,60	30,8±2,43	0,96±0,69
Гіперхлоремічний ацидоз (n=45)	7,34±0,04	26,4±1,21	22,34±1,45	16,6±0,5*	15,5±0,31*	-5,04±0,63*
Молочнокислий ацидоз (n=45)	7,39±0,01	28,9±1,58	28,05±1,89	19,1±0,7	18,28±0,66*	-3,05±0,48*
Голодування протягом 1 доби (n=18)	7,42±0,03	24,30±5,66	35,15±5,26	20,6±3,0*	19,9±2,53*	-1,50±0,85*
протягом 3 діб (n=24)	7,39±0,04	49,9±14,19	26,64±4,02*	15,3±2,8*	14,57±2,5*	-7,2±2,49*

Примітка. Тут і в таб. 2, 3 * P < 0,05.

зменшується показник інгібітори/еластаза при усіх видах ацидозу порівняно з контролем.

За умов моделювання різних видів ацидозу в сироватці крові теж відбуваються певні зміни, які нагадують такі в гомогенатах аорти (табл.3). Активність еластази вірогідно підвищується при гіперхлоремічному ацидозі (в 2,8 раза), тридобовому голодуванні (в 2,5 раза), однодобовому – у 1,8 раза порівняно з контролем (13,62 мкмоль р-NA·год⁻¹ ± 2,45 мкмоль р-NA·год⁻¹), при молочнокислому ацидозі цей показник істотно не змінюється і становить 18,09 мкмоль р-NA·год⁻¹ ± 2,26 мкмоль р-NA·год⁻¹. Вміст α₂-М вірогідно

зменшується при гіперхлоремічному, молочнокислому ацидозі, а також при голодуванні протягом трьох діб. Цей показник змінюється незначно при однодобовому голодуванні (1,36 г/л ± 0,09 г/л, у контролі – 1,70 г/л ± 0,17 г/л). α₁-ІІ вірогідно підвищується в 1,2 раза при молочнокислому ацидозі, одно- та тридобовому голодуванні, в той час як при гіперхлоремічному ацидозі дещо зменшується.

Аналізуючи отримані результати, перш за все слід зазначити, що існує чітка залежність між рівнем зниження рН крові, ступенем порушення кислотно-лужної рівноваги та активністю еластази у сироватці крові щурів за умов моделювання ацидозу. Ще

Таблиця 2. Активність еластази, вміст α₂-макроглобуліну та α₁-інгібітора протеїназ у гомогенатах аорти щурів за умов моделювання ацидозу (M±m)

Схема досліджу	Активність еластази, мкмоль р-NA·год ⁻¹ ·г ⁻¹ білка	α ₂ -макроглобулін, мг·г ⁻¹ білка	α ₁ -інгібітор протеїназ, мг·г ⁻¹ білка	Інгібітори / еластаза, ум. од.
Контроль (n=8)	4,21 ± 0,35	16,72 ± 0,94	2,33 ± 0,29	4,52
Гіперхлоремічний ацидоз (n=15)	6,51 ± 1,63	4,88 ± 0,25*	2,67 ± 0,78	1,16
Молочнокислий ацидоз (n=15)	11,88 ± 2,83*	15,97 ± 1,56	8,07 ± 0,24*	2,02
Голодування протягом 1 доби (n=6)	13,96 ± 2,72*	13,28 ± 3,05	4,26 ± 0,99*	1,26
протягом 3 діб (n=8)	13,9 ± 1,75*	6,22 ± 0,90*	2,28 ± 0,58	0,61

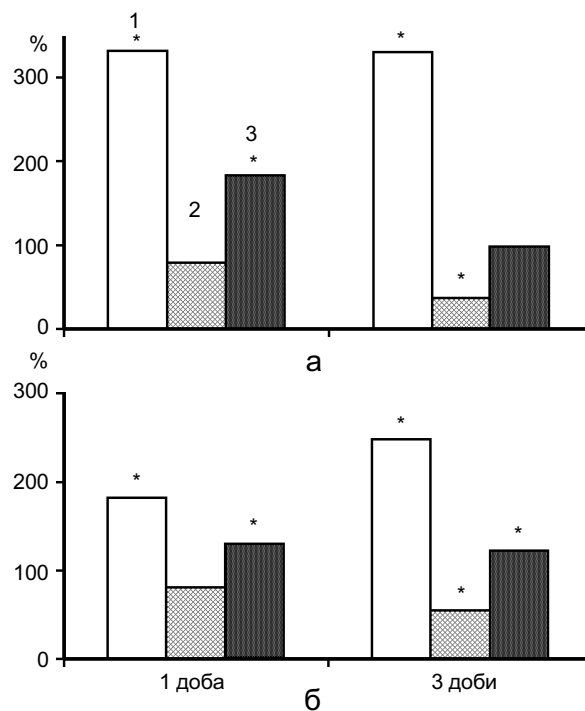
Таблиця 3. Активність еластази, вміст α_2 -макроглобуліну та α_1 -інгібітора протеїназ у сироватці крові щурів за умов моделювання ацидозу ($M \pm m$)

Схема досліджу	Активність еластази, мкмоль р-NA·год ⁻¹ ·л ⁻¹	α_2 -макроглобулін, г/л	α_1 -інгібітор протеїназ, г/л	Інгібітори / еластаза, ум. од.
Контроль (n=25)	13,62 ± 2,45	1,70 ± 0,17	1,82 ± 0,10	258,4
Гіперхлоремічний ацидоз (n=45)	37,47 ± 10,43*	0,66 ± 0,17*	1,73 ± 0,17	63,8
Молочнокислий ацидоз (n=45)	18,09 ± 2,26	0,66 ± 0,03*	2,13 ± 0,06*	154,2
Голодування				
протягом 1 доби (n=18)	24,85 ± 3,43*	1,36 ± 0,09	2,36 ± 0,12*	148,9
протягом 3 діб (n=24)	33,71 ± 3,17*	0,94 ± 0,11*	2,24 ± 0,08*	94,3

більш показовим є взаємозв'язок ступеня порушення кислотно-лужної рівноваги та співвідношення інгібітори/еластаза, яке істотно зменшується у разі декомпенсованого гіперхлоремічного ацидозу, а особливо це виражено при подовженні терміну голодування. Зв'язок між показниками кислотно-лужної рівноваги крові щурів та показниками активності еластолізу в аорті щурів є менш очевидним. Наприклад, при тому ж гіперхлоремічному ацидозі активність еластази в аорті суттєво не відрізняється від контролю та не підвищується розвитком кетоацидемічного ацидозу (рисунок, а). Але якщо звернути увагу на інтегральний показник (співвідношення інгібітори/еластаза в аорті), то залежність між рівнем порушення кислотно-лужного стану та зазначеною протеолітичною системою проявляється так само чітко, як і у сироватці крові. Знов таки, найбільшою мірою зниження цього коефіцієнта відбувається при більш важких видах ацидозу (гіперхлоремічний ацидоз і кетоацидоз внаслідок голодування протягом трьох діб).

Більш складним є пояснення істотних відмінностей у значеннях активності еластолізу при різних видах ацидозу. Як, наприклад, пояснити, що вміст α_2 -М у сироватці крові зменшується однаково при гіперхлоремічному та лактат-ацидозі, тоді як вміст α_1 -ІІІ не відрізняється від контролю при гіперхлор-

мічному ацидозі та вірогідно збільшується у разі введення молочної кислоти. Однією з причин може бути характер впливу відповідних чинників, а саме хлористого амонію, молочної кислоти та кетонів тіл на мета-



Зміни активності еластази (1), вмісту α_2 -макроглобуліну (2), α_1 -інгібітора протеїназ (3) у тканинах аорти (а) та в сироватці крові (б) щурів при голодуванні (% відносно контрольних значень).

болічні процеси в організмі та особливості його адаптації до зрушень кислотно-лужної рівноваги. При введенні хлористого амонію відбувається активація утворення сечовини у печінці, а надлишок іонів хлору порушує співвідношення катіонів і аніонів у сироватці крові і ємність буферних основ. Не виключено, що зниження вмісту інгібіторів еластази у сироватці крові при гіперхлоремічному ацидозі пов'язано саме з порушенням синтезу їх у печінці. Значне підвищення інтенсивності протеолізу при голодуванні певною мірою може бути пов'язано з активацією неоглюкогенезу, для забезпечення якого необхідні вільні амінокислоти, що утворюються при гідролізі ендогенних білків [12, 13, 17]. Прогресивне зменшення співвідношення інгібіторів та еластази її в сироватці крові в динаміці голодування підтверджує висловлену думку (див. рисунок, б). Поступове зменшення вмісту α_2 -М при голодуванні частково пояснюється тим, що внаслідок переключення енергетичного забезпечення організму на окиснення ліпідів змінюється обмін ліпопротеїдів низької щільності. Останні мають спільний з α_2 -М рецептор, експресія якого на клітинах підвищується при обмеженому споживанні жирів [9]. Опосередковано через рецептор, активований взаємодією з протеїназами (зокрема, еластазою) α_2 -М поглинається клітинами судинної стінки (фібробласти, гладеньком'язові клітини) або гепатоцитами [8, 15], чим і пояснюється поступове зменшення вмісту цього інгібітора при голодуванні.

ВИСНОВКИ

1. У разі моделювання різних видів ацидозу відбувається порушення балансу в системі еластаза – інгібітори в тканинах аорти та сироватці крові щурів, причому ступінь цих зрушень тісно пов'язана з вираженістю змін показників кислотно-лужної рівноваги.

2. При різних видах ацидозу коефіцієнт інгібітори/еластаза в аорті та сироватці крові зменшується внаслідок зниження вмісту α_2 -М та збільшення активності еластази.

3. Отримані результати свідчать про те, що одним з механізмів ушкодження судинної стінки, що відбувається при ацидозі, є порушення балансу між еластазою та її інгібіторами в тканинах артеріальних судин.

I.M.Trofimova, V.E.Dosenko, Yu.V.Byts

ACTIVITY OF ELASTASE AND ITS INHIBITORS IN TISSUES OF AORTA AND BLOOD SERUM IN DIFFERENT TYPES OF ACIDOSIS

In modeling of different types of acidosis (hyperchloraemic, lactate and ketoacidosis in the starvation) at rats the elastase activity, contents of alpha-2 macroglobulin (alpha2M) and alpha-1 proteinase inhibitor (alpha1PI) in aorta tissues and blood serum were studied. The obtained results indicate that the degree of disturbance in system elastase - inhibitors depends on expressiveness of parameters changes in system of acid-base state regulation. In modeling of various types of acidosis coefficient inhibitors / elastase is reduced due to different parameters change in aorta, namely decrease of alpha2M contents – in hyperchloraemic acidosis, increase of elastase activity - in lactat-acidosis, increase of elastase activity and decrease of alpha2M contents - in ketoacidosis. In blood serum the similar coefficient is reduced due to increase of elastase activity and decrease of alpha2M contents in hyperchloraemic acidosis and starvation, and, in turn, due to decrease of alpha2M contents - in lactat-acidosis. The obtained data indicate that one of mechanisms of vascular wall damage in acidosis is disturbance of balance between elastase and its inhibitors in tissues of arteries.

A.A. Bogomoletz National Medical University, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Биць Ю.В., Досенко В.Є. Роль еластази в патогенезі артеріосклерозу // Пробл. медицини. - 1999. - №5. - С. 10-17.
2. Веремеєнко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в нормі і при патології. - К.: Здоров'я, 1988. - 198 с.
3. Досенко В.Є. Баланс еластази та її інгібіторів в тканинах судин кролів різного віку на ранніх стадіях експериментального артеріосклерозу

- менкебергівського типу // Фізіол. журн. - 1999. - 45, №5. - С.60-67.
4. Жалко-Титаренко В.Ф. Водно-электролитный обмен и кислотно-основное состояние в норме и при патологии. - К.: Здоров'я, 1989. - 199 с.
 5. Кальнова Л.И. Кислотно-основное состояние. - В кн.: Руководство по клинической лабораторной диагностике. - Ч. 3. Клиническая биохимия / Под ред. М.А.Базарновой, В.Т.Морозовой. - К.: Вища школа, 1986. - С.266-287.
 6. Кришталь М.В. Нейро-гуморальна регуляція компенсаторних реакцій нирок при метаболічному ацидозі: Автореф. дис. ... д-ра мед.наук. - К., 1994. - 43с.
 7. Bailey J.L., Wang X., England B.K. et al. The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway // J. Clin. Invest. - 1996. - 97, N6. - P.1447-1453.
 8. Bonner J.C., Badgett A., Hoffman M., Lindroos P.M. Inhibition of platelet-derived growth factor-BB-induced fibroblast proliferation by plasmin-activated alpha 2-macroglobulin is mediated via an alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism // J. Biol. Chem. - 270, N11. - P.6389-1995.
 9. Boucher P., de Lorgeril M., Salen P. et al. Effect of dietary cholesterol on low density lipoprotein-receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and low density lipoprotein receptor-related protein mRNA expression in healthy humans // Lipids. - 1998. - 33, N12. - P.1177-1186.
 10. Dzurik R, Spustova V, Janekova K. The prevalence of insulin resistance in kidney disease patients before the development of renal failure // Nephron. - 1995. - 69, N3. - P.281-285.
 11. England BK, Jurkovitz C Effect of glucocorticoids and extracellular pH on protein metabolism in cultured cells // Miner. Electrolyte Metab. - 1992. - 18(2-5). - P.316-319
 12. England B.K., Price S.R. Acidosis and glucocorticoids interact to provoke muscle protein and amino acid catabolism // Blood Purif. - 1995. - 13, №3-4. - P.147-152.
 13. Greiber S., Mitch W.E. Mechanisms for protein catabolism in uremia: metabolic acidosis and activation of proteolytic pathways // Miner. Electrolyte Metab. - 1992. - 18, №2-5. - P.233-236.
 14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - 193. - P.265-275.
 15. Lysiak J.J., Hussaini I.M., Webb D.J. et al. Alpha 2-macroglobulin function as a cytokine carrier to induce nitric oxide synthesis and cause nitric oxide-dependent cytotoxicity in the RAW 264.7 macrophage cell line // Ibid. - 270, N37. - P.21919.-1995.
 16. Maeda H., Molla A., Oda T., Katsuki T. Internalization of serratial protease into cells as an enzyme-inhibitor complex with alpha 2-macroglobulin and regeneration of protease activity and cytotoxicity // Ibid. - 1987. - 262, N23.- P. 10946-10950.
 17. May R.C., Masud T., Logue B. et al. Chronic metabolic acidosis accelerates whole body proteolysis and oxidation in awake rats // Kidney Int. - 1992. - 41, №6. - P.1535-1542.
 18. Mitch W.E., Bailey J.L., Wang X. et al. Evaluation of signals activating ubiquitin-proteasome proteolysis in a model of muscle wasting // Chung Hua Min Kuo Hsiao Erh Ko I Hsueh Hui Tsa Chih. - 1998. - 39, N1. - P.21-27.
 19. Mitch W.E., Medina R., Griebler S. et al. Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes // J. Clin. Invest. - 1994. - 93, N5. - P.2127-2133.
 20. Sottiaux J. Atherosclerosis in a dog with diabetes mellitus // J. Small. Anim. Pract. - 1999. - 40, N12. - P.581-584.
 21. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels // Diabetes. - 2001. - 50, N4. - P.851-860.

Нац. мед. ун-т ім. О.О.Богомольця

*Матеріал надійшов
до редакції 11.07.2001*