

**Еластази при штучному гіпометаболізмі у щурів**

UDC 616.379-008.9-056.7.001.6-092:577.15

L.M. SAMOKHINA<sup>1\*</sup>, V.V. LOMAKO<sup>2</sup>, A.V. SHILO<sup>2</sup>**Elastases Under Artificial Hypometabolism in Rats**

Розвиток ШГМС у щурів за методом Анджуса-Бахметьєва-Джайя призводить до тканинспецифічного підвищення активності еластази, металоеластази та зниження рівня ендотеліальної еластази. Ці зміни частково нормалізуються через 24 год, при цьому  $\alpha$ -1-інгібітора протеїназ залучається до пригнічення надлишкової активності еластаз в деяких тканинах.

**Ключові слова:** еластаза, ендотеліальна еластаза, металоеластаза,  $\alpha$ -1-інгібітор протеїназ, штучний гіпометаболічний стан.

Развитие искусственного гипометаболического состояния у крыс способствует тканеспецифическому повышению активности эластазы, металлоэластазы и снижению уровня эндотелиальной эластазы. Эти изменения приближаются к контрольному уровню через 24 ч, при этом отмечено участие  $\alpha$ -1-ингибитора протеиназ в угнетении избыточной активности эластаз.

**Ключевые слова:** эластаза, эндотелиальная эластаза, металлоэластаза,  $\alpha$ -1-ингибитор протеиназ, искусственное гипометаболическое состояние.

The development of artificial hypometabolism in rats contributes to tissue-specific rise in elastase activity, metalloelastase and decreased level of endothelial elastase. These changes are partially normalized in 24 hrs, herewith there was noted the participation of alpha-1-inhibitor of proteinases in suppressing of surplus activity of elastases.

**Key-words:** elastase, endothelial elastase, metalloelastase, alpha-1-inhibitor of proteinases, artificial hypometabolic state.

Дослідження адаптивної відповіді організму на вплив фізичних факторів, особливо тригерів гіпометаболічних станів (ГМС), що характеризуються зворотним зниженням інтенсивності обмінних процесів [5], має велике значення для біології та медицини. Перспективним є вивчення ендогенних захисних систем клітин і організму, які підвищують їх неспецифічну резистентність. Важливу роль у формуванні неспецифічної відповіді організму відіграють протеїнази, які здійснюють свою регуляторну функцію в реакціях лімітованого протеолізу з розщепленням одного або декількох специфічних пептидних зв'язків в молекулах білків, а також утворюють активні форми білків та пептидів. Однією з таких протеїназ є еластаза (Ел) (КФЗ.4.21.37) – серінова протеїназа азурофільних гранул нейтрофільних гранулоцитів, яка підвищує каталітичну здатність інших протеолітичних ферментів [8], гідролізує еластин, протеоглікани, гемоглобін, фібриноген, неспіральні ланцюги колагену, розщеплює поперечні зв'язки між ними та інш. [1]. Подібну дію мають серінова Ел гладком'язових клітин, металоеластаза макрофагів (матрична металопротеаза 12) і тіолова Ел ендотеліоцитів [2].

Мета роботи – дослідити активність еластаз при штучному гіпометаболічному стані у щурів.

**Матеріали і методи**

Штучний гіпометаболічний стан (ШГМС) викликали у дорослих щурів-самців узимку за методом Анджуса-Бахметьєва-Джайя [3]: тварин тримали 3 год у герметично закритій камері (об'єм 3 дм<sup>3</sup>), яку поміщали в темну холодову камеру при температурі 3–5°C. Після розвитку ШГМС тварин вилучали із камери і переводили в умови з нормальним газовим складом повітря і температурою 22–24°C.

Експерименти проведені відповідно до “Загальних принципів експериментів на тваринах”, схвалених II Національним конгресом з біоетики (20.09.2004 р., м. Київ) і узгоджених з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1985 р.).

Досліджено 4 групи тварин (n = 5): контроль, ШГМС, через 2 та 24 год після ШГМС (ранній і пізній етапи відновлення). Тварин декапітували. У без'ядерних фракціях гомогенатів тканин кори (КМ) і стовбуру (СМ) мозку, легень, серця, печінки і нирок визначали: загальну активність еластаз; активність ендотеліальної (тіолової) Ел (ЕЕл) і макрофагальної Ел (металоеластази) (метЕл); еластазо-

<sup>1</sup>ДУ “Інститут терапії імені Л.Т. Малої АМН України”, м. Харків

<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

\* Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>State Enterprise “Institute of Therapy Named After L.T. Malaya of Academy of Medical Sciences”, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

інгібіторну активність  $\alpha$ -1-інгібітора протеїнази (ЕІА  $\alpha$ -1-ІІІ) високочутливим ( $10^{-10}$ – $10^{-12}$  од/мл) ферментативним методом [6]. Принцип методу засновано на використанні в якості субстрату протеолітичної реакції іммобілізованого на поверхні полістиролу маркерного ферменту – пероксидази хрому (ПХ), який завчасно був кон'югований із Ala-Ala. Для контрольних вимірювань використовували розчини Ел активністю від 0,0005 до 0,5 од/мг білка.

Для визначення активності ЕЕл перед протеолітичною реакцією пригнічували серінові протеїнази та металопротеїнази додаванням до дослідних зразків 1:1 інгібіторного розчину, який містить 0,02 % фенілсульфонілфлюориду (ФСФ) та 6 % етилендіамінтетраацетату (ЕДТА). Для визначення активності метЕл перед протеолітичною реакцією пригнічували серінову Ел та тіолову ЕЕл додаванням до дослідних зразків 0,04 % ФСФ та 0,1 % моноіодацетату. Інкубували 5 хв при 37°C. Для визначення ЕІА  $\alpha$ -1-ІІІ перед протеолітичною реакцією до досліджуваних зразків додавали надлишок еластази 1:1 (розчин активністю 0,5 од/мг білка) для зв'язування з інгібітором, інкубували 15 хв при 20°C. Після протеолітичної реакції відмиванням видаляли продукти реакції і визначали оптичну щільність ПХ. Одержані результати виражали в одиницях на міліграм білка. У дослідженнях використовували ПХ, ФСФ, моноіодацетат фірми "ICN" (США), Ala-Ala фірми "Fluka" (Німеччина), Ел, ЕДТА, полістиролові плашки стріпові (Росія) та фотометр-аналізатор імуноферментний Humanreader № 2106-1709 фірми «Human» (Німеччина).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за методом Стьюдента-Фішера з використанням програмного забезпечення Excel.

### Результати і обговорення

Виявлено, що при ШГМС активність Ел зростає у всіх зразках, окрім СМ (табл. 1). Це може бути обумовлено розвитком оксидативного стресу, пошкодженням клітинного гомеостазу, індукованими гіпотермічною складовою ШГМС [7]. При оксидативному стресі відбувається активація нейтрофілів, які здатні вивільняти серінову Ел разом з вільними радикалами та іншими ферментами [4]. Відсутність зростання активності Ел у СМ обумовлена імовірно наявністю її високого локального вихідного рівня. Через 2 год активність Ел підвищується майже у всіх органах, крім нирок, де вона повертається до контрольного рівня. Через 24 год активність Ел у всіх зразках знижується, що вказує на її можливе залучення в деструктивних процесах на фоні відсутності синтезу та/або вивільнення.

Активність ЕЕл при ШГМС знижується у всіх зразках, що також може бути наслідком її витрачання на фоні відсутності вивільнення ЕЕл ендотеліоцитами, це, можливо, пов'язано зі зменшенням еластичності судинної стінки. Активність ЕЕл відновлюється лише у СМ через 2 год, що імовірно обумовлено суттєвою роллю цієї структури в регуляції функцій внутрішніх органів. Через 24 год відзначена тенденція до зростання активності ЕЕл у серці і нирках, що може свідчити про стимулювання, в першу чергу, функціонування структур серцево-судинного центру, ендотелію судин серця та нирок.

Активність метЕл при ШГМС значно зростає в КМ та печінці, менш – в легенях, що, імовірно, обумовлено локальною активацією макрофагів, яка, можливо, пов'язана з розвитком деструктивних процесів, порушенням функціонування більшості сенсорних шляхів, усіх рухових шляхів, які передають сигнали управління від півкуль головного мозку, це може безпосередньо впливати на зниження інтенсивності обмінних процесів в організмі, найбільш у печінці. Активність метЕл через 2 год залишається підвищеною у мозку, повертається до контрольного рівня в печінці, зростає в серці, нирках і знижується порівняно з ШГМС у легенях, що вказує на недостатній термін для повного відновлення організму; через 24 год вона знижується порівняно з контрольним рівнем, особливо в легенях, це може свідчити про її залучення до деструктивних процесів на фоні відсутності синтезу та/або вивільнення макрофагами і обумовлювати недостатнє поновлення функціонування легень порівняно з нормою. В серці через 24 год виявлено більш високий рівень металоеластази, що може свідчити про локальну активацію макрофагів і бути пов'язано з нормалізацією діяльності серця. Ймовірно залучення метЕл і до деструктивних процесів [4].

Еластазоінгібіторна активність  $\alpha$ -1-ІІІ при ШГМС практично не змінюється, це може вказувати на первинний характер впливу таких факторів ШГМС, як гіпоксія, гіпотермія, гіперкапія, на активність еластаз (табл. 2). Але через 2 год після ШГМС ЕІА  $\alpha$ -1-ІІІ вірогідно знижується в КМ та нирках, що пов'язано з участю даного інгібітора в пригніченні надлишкової активності еластаз. Через 24 год вказані зміни нормалізуються, крім того, ЕІА  $\alpha$ -1-ІІІ вірогідно зростає в легенях. Це може обумовлювати суттєве зниження активності серінової Ел, металоеластази, в меншому ступені – ЕЕл.

Еластазоінгібіторна активність  $\alpha$ -1-ІІІ при ШГМС практично не змінюється, це може вказувати на первинний характер впливу таких факторів ШГМС, як гіпоксія, гіпотермія, гіперкапія, на активність еластаз (табл. 2). Але через 2 год після ШГМС ЕІА  $\alpha$ -1-ІІІ вірогідно знижується в КМ та нирках, що пов'язано з участю даного інгібітора в пригніченні надлишкової активності еластаз. Через 24 год вказані зміни нормалізуються, крім того, ЕІА  $\alpha$ -1-ІІІ вірогідно зростає в легенях. Це може обумовлювати суттєве зниження активності серінової Ел, металоеластази, в меншому ступені – ЕЕл.

### Висновки

Розвиток ШГМС у щурів за методом Анджуся-Бахметьєва-Джайя призводить до тканиноспецифічного зростання активності еластази, металоеластази та зниження рівня ендотеліальної еластази. Ці зміни частково нормалізуються через 24 год, при цьому  $\alpha$ -1-ІІІ залучається до пригнічення надлишкової активності еластаз в деяких тканинах.

**Таблиця 1. Активність еластаз (од/мг білка) при ШГМС у щурів**

Зразки	Контроль	ШГМС	Етапи відновлення	
			ранній (2 год)	пізній (24 год)
Активність еластази				
КМ	0,0021±0,0007	0,037±0,012 <sup>1</sup>	0,046±0,015 <sup>2</sup>	0,00018±0,00006 <sup>4</sup>
СМ	0,029±0,007	0,028±0,009	0,015±0,005	0,00003±0,00001
Легені	0,0003±0,0001	0,023±0,009 <sup>1</sup>	0,020±0,006 <sup>1</sup>	0,00005±0,00001
Серце	0,0019±0,0006	0,021±0,007	0,012±0,003 <sup>2</sup>	0,00024±0,00008 <sup>4</sup>
Печінка	0,0067±0,0024	0,021±0,007	0,037±0,011	0,00017±0,00005 <sup>1</sup>
Нирки	0,0018±0,0006	0,020±0,006	0,004±0,001	0,0003±0,0001
Активність ендотеліальної еластази				
КМ	0,0089±0,0031	0,0011±0,0003	0,0015±0,0005	0,00046±0,00015
СМ	0,0015±0,0002	0,00007±0,00002 <sup>1</sup>	0,0046±0,0015	0,0004±0,0001 <sup>1</sup>
Легені	0,0034±0,0011	0,0008±0,0002	0,0022±0,0006	0,0004±0,0001 <sup>4</sup>
Серце	0,0101±0,0027	0,0023±0,00085 <sup>1</sup>	0,0010±0,0002 <sup>2</sup>	0,0046±0,0012
Печінка	0,0187±0,0052	0,0009±0,0002 <sup>2</sup>	0,0013±0,0004 <sup>3</sup>	0,00071±0,00022 <sup>1</sup>
Нирки	0,0155±0,0051	0,0012±0,0004	0,0015±0,0003	0,0035±0,0011
Активність металоеластази				
КМ	0,0010±0,0003	0,024±0,008	0,012±0,002 <sup>2</sup>	0,00010±0,00002 <sup>4</sup>
СМ	0,0018±0,0005	0,006±0,001 <sup>3</sup>	0,051±0,017	0,00006±0,00001 <sup>5</sup>
Легені	0,0023±0,0005	0,0054±0,0016	0,0015±0,0005 <sup>5</sup>	0,00007±0,00001 <sup>1,4,5</sup>
Серце	0,0025±0,0008	0,0023±0,0004	0,0073±0,0030	0,0020±0,0006
Печінка	0,0033±0,0012	0,024±0,008	0,0028±0,0011	0,00025±0,00008
Нирки	0,0018±0,0006	0,0006±0,0002	0,015±0,005	0,00017±0,00005

**Примітка:** <sup>1,2,3</sup> – ступінь вірогідності відмінностей порівняно з контролем (p<0,05, 0,01, 0,001) відповідно; <sup>4</sup> – після 2 год відновлення (p<0,05); <sup>5</sup> – порівняно з ШГМС (p<0,05).

**Таблиця 2. Еластазоінгібіторна активність α-1-інгібітора протеїназ (од/мг білка) при ШГМС у щурів**

Зразки	Контроль	ШГМС	Етапи відновлення	
			ранній (2 год)	пізній (24 год)
КМ	0,988±0,003	0,974±0,012	0,920±0,032 <sup>1</sup>	0,984±0,001
СМ	0,967±0,013	0,989±0,003	0,894±0,068	0,980±0,004
Легені	0,9967±0,0007	0,992±0,002	0,956±0,023	0,9993±0,0003 <sup>2</sup>
Серце	0,994±0,001	0,968±0,013	0,956±0,023	0,9968±0,0017
Печінка	0,994±0,001	0,973±0,017	0,971±0,010	0,997±0,001

**Примітка:** <sup>1,2</sup> – ступінь вірогідності відмінностей порівняно з контролем (p<0,05, 0,01) відповідно.

## Література

1. *Антоняк Г.Л.* Роль протеолитических ферментов в функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов // *Успехи совр. биологии.*– 1999.– Т. 119, № 5.– С. 476–486.
2. *Досенко В.Е.* Определение различных форм эластазы в аорте при экспериментальном артериосклерозе // *Лаб. диагностика.*– 1998.– №1.– С.24.
3. *Мельничук С.Д., Мельничук Д.О.* Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини).– Київ, 2007.– 220 с.
4. *Самохіна Л.М., Коваль С.М., Старченко Т.Г. та інш.* Еластази, катепсин G та продукти перекисного окислення ліпідів у хворих на гіпертонічну хворобу з супутнім цукровим діабетом 2-го типу // *Медична хімія.*– 2004.– №4.– С. 68–72.
5. *Самохіна Л.М., Самохин А.А.* Химаза, тонин и эластаза у крыс при окислительном стрессе, вызванном введением хлорида кобальта // *Укр. биохим. журн.*– 2001.– Т. 73, № 5.– С. 47–51.
6. *Тимофеев Н.Н., Прокопьева Л.П.* Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма.– М.: Медицина, 1997.– 208 с.
7. *Пат. України №45068А МПК G01N33/48, А61В19/02.* Набір для визначення активності ендотеліальної еластази в біологічних рідинах / Л.М.Самохіна, Н.А.Максимова. Заявл. 23.04.2001; Опубл. 15.03.2002.– Бюл.№ 3.
8. *Blagojevic D.R.* Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures // *Cryo-Letters.*– 2007.– Vol. 28, N3.– P. 137–150.
9. *Shamamian P., Pocock B.J., Schwarts J.D. et al.* Neutrophil-derived serine proteinases enhance membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent tumor cell invasion // *Surgery.*– 2000.– Vol. 127, N2.– P. 142–147.

*Надійшла 14.07.2008*