

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

## Вплив порушень кислотно-лужного стану на баланс еластази та її інгібіторів у сироватці крові та тканинах аорти щурів

*В експериментах по моделюванню порушень кислотно-основного состояния - ацидоза (введение молочной кислоты или хлористого аммония) и алкалоза (введение гидрокарбоната натрия) - у крыс изучалась активность эластазы, содержание  $\alpha_2$ -макроглобулина и  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ в сыворотке крови и тканях аорты. Полученные результаты указывают на то, что при моделировании ацидоза и алкалоза наблюдается нарушение баланса между эластазой и её ингибиторами. Однако при гиперхлоремическом ацидозе в гомогенатах аорты коэффициент ингибиторы/эластаза уменьшается за счет снижения содержания  $\alpha_2$ -макроглобулина, а при молочнокислом ацидозе – только за счет увеличения активности эластазы. При алкалозе содержание ингибиторов протеиназ даже увеличивается, но значительное увеличение активности эластазы определяет уменьшение интегрального коэффициента. В сыворотке в целом наблюдаются аналогичные изменения, за исключением того, что активность эластазы значительно увеличивается при гиперхлоремическом ацидозе и достоверно не изменяется при лактат- ацидозе. Таким образом, нарушение баланса в эластолитической системе при нарушении кислотно-основного состояния может способствовать деградации эластических волокон аорты, которая рассматривается как один из инициальных механизмов в патогенезе атеросклероза.*

### ВСТУП

Здатність до підтримання кислотно-лужного стану є одним із найважливіших показників нормальної життєдіяльності організму [2, 3]. Відомо, що активність переважної більшості ферментних систем, у тому числі і протеїназ, залежить від концентрації іонів водню. Той чи інший ензим проявляє свої каталітичні властивості при оптимальних для нього значеннях рН: для трипсину 7,4 – 8,0, для еластази нейтрофілів – 8,0 – 8,1 [1]. Незважаючи на наявність такого зв'язку, в літературі обмаль даних про вплив порушень кислотно-лужного стану (ацидозу чи алкалозу) на активність протеолітичних систем крові та тканин. Проте доведено велике патогенетичне значення порушень кислотно-лужного стану при атеросклерозі, при макро- та мікроангіопатіях, які ускладнюють перебіг артері-

альної гіпертензії, цукрового діабету, нефропатій тощо [2, 4, 5, 15]. Ще у роботах Valo [7] наводяться докази того, що при моделюванні ацидозу введенням  $\text{NH}_4\text{Cl}$  відбуваються склеротичні зміни в аорті та інших судинах. Найбільше ушкоджувалася внутрішня еластична мембрана. Ці досліді дозволили висунути ідею про первинне ураження еластичної тканини як вузловий момент патогенезу атеросклерозу. Пошкодження еластичних елементів при ацидозі спостерігалось і в інших органах і тканинах. Це дало можливість припустити, що атеросклероз є одним із проявів загальних порушень структури та функції еластичних волокон, загалом процесів, які мають відношення до метаболізму еластину. Визначення антиеластазної активності крові, так званого "інгібітора еластази" за Valo, вказувало на вірогідне його

зменшення зі збільшенням строку експерименту.

Сучасні клінічні дослідження підтверджують дані про тісний взаємозв'язок рН крові та активності протеолітичних ферментів [5, 6, 8, 11, 16]. Характерно, що автори вказаних робіт не зіставляють дані про активність протеїназ із вмістом інгібіторів певних ферментів, хоча доводять значення змін рН у кислий бік як фактора порушення балансу у системах протеолізу. Враховуючи викладене, метою нашого дослідження було визначення саме балансу між еластазою та її інгібіторами при моделюванні гіперхлоремічного, молочнокислого ацидозу та негазового алкалозу.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на 160 статевозрілих щурах масою  $173,75 \text{ г} \pm 35,95 \text{ г}$ . У тварин моделювали негазовий гіперхлоремічний ацидоз введенням  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 ммоль/кг); молочнокислий ацидоз - молочної кислоти (20 ммоль/кг); негазовий алкалоз -  $\text{NaHCO}_3$  (20 ммоль/кг) [4]. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 1 год після введення препарату. Після видалення аорти через торакоабдомінальний розтин її негайно занурювали в 0,05 моль/л тріс- $\text{HCl}$  буфер (рН 7,4) при температурі  $4^\circ\text{C}$ . Смужки судин гомогенізували в 0,05 моль/л тріс- $\text{HCl}$  буфері (рН 7,4) з додаванням 0,25% неіонного детергенту Тритон Х-100 при температурі  $4^\circ\text{C}$ , використовуючи гомогенізатор скло - скло. Гомогенати центрифугували при  $6000 \text{ хв}^{-1}$  (3500g) 10 хв, супернатант використовували для біохімічного аналізу. В одну пробу об'єднували смужки аорт від трьох тварин. Сироватку крові отримували центрифугуванням при  $3000 \text{ хв}^{-1}$  (900 g) протягом 15 хв.

Еластазну активність визначали за гідролізом специфічного хромогенного субстрату  $\text{Suc}-(\text{Ala})_3\text{-p-NA}$  та виражали в мікромолях  $\text{p-NA}$  за 1 год на 1 г білка в тканинах судин і в мікромолях  $\text{p-NA}$  за 1 год в 1 л у сироватці крові. Вміст  $\alpha_2$ -макроглобуліну ( $\alpha_2\text{-M}$ ) та  $\alpha_1$ -інгібітора протеїназ ( $\alpha_1\text{-ІІІ}$ ) визначали

з використанням  $\text{N-бензоїл-DL-аргінін-p-NA}$  (БАПНА) [1]. Вміст білка в гомогенатах тканин визначали за методом Lowry [12].

Показники кислотно-лужної рівноваги: від'ємний логарифм концентрації іонів водню (рН), парціальний тиск кисню ( $\text{pO}_2$ ), парціальний тиск вуглекислого газу ( $\text{pCO}_2$ ), гідрокарбонат крові ( $\text{HCO}_3^-$ ), загальний вміст вуглекислого газу ( $\text{TCO}_2$ ) і зсув буферних основ (ВЕ) вимірювали за допомогою газового аналізатора ОР-215 "Radelkis" (Угорщина).

Отримані результати обробляли математично на ПК IBM AMD 5x86 з використанням програм Sigma Plot 5.0, Excel 97; визначали вірогідність різниці середніх значень за критерієм  $t$  Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В таблиці наведено значення деяких показників кислотно-лужної рівноваги для оцінки характеру та ступеня важкості порушень, які виникають. Слід відзначити розвиток декомпенсованого ацидозу при введенні  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (значно знижений показник рН, різке зменшення вмісту загального гідрокарбонату крові,  $\text{TCO}_2$  та від'ємне значення показника ВЕ), а також компенсованого ацидозу (неістотне зниження рН крові поряд із суттєвими змінами ємності буферних основ) при введенні молочної кислоти. У разі моделювання алкалозу спостерігалось вірогідне підвищення рН, збільшення вмісту буферних основ і позитивну зміну показника ВЕ. Таким чином, підтверджено відтворення відповідних зрушень кислотно-лужної рівноваги при використанні у наших дослідах добре відомих експериментальних методик [4].

Після вимірювання показників кислотно-лужної рівноваги у тварин вивчалась еластазна активність і вміст основних її інгібіторів у аорті при моделюванні гіперхлоремічного негазового ацидозу.

Із результатів (рис. 1) випливає, що в гомогенатах аорти щурів при моделюванні гіперхлоремічного ацидозу спостерігалось вірогідне зменшення  $\alpha_2\text{-M}$  у 3,4 раза ( $4,88 \pm 0,25$ ;  $P < 0,01$ ), та, навпаки, незначне збільшення

**Таблиця 1. Показники кислотно-лужної рівноваги крові щурів**

| Умова досліджу                 | PH          | PO <sub>2</sub> | PCO <sub>2</sub> | TCO <sub>2</sub> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | BE              |
|--------------------------------|-------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|
| Контроль (n=25)                | 7,4± 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 * |
| Негазовий алкалоз (n=45)       | 7,58± 0,04* | 24,52±0,90      | 35,92 ± 3,19     | 38,4 ± 3,0       | 36,9 ± 3,02                   | 13,12 ± 3,12 *  |

\* P < 0,05.

вмісту α<sub>1</sub>-ІІІ. Активність еластази теж підвищувалася - в 1,5 раза порівняно з контролем (4,21 ± 0,35; 6,51 ± 1,63; P>0,05). Відношення суми обох інгібіторів до активності еластази при цьому знижувалося (1,16 і 4,52 відповідно). У сироватці крові за умов моделювання ацидозу спостерігали вірогідне зменшення вмісту α<sub>2</sub>-М на 61,2% (P<0,001) і незначне зменшення α<sub>1</sub>-ІІІ (рис. 2). Активність еластази при цьому вірогідно підвищувалася в 2,8 раза (P<0,05). Однак відношення інгібітори/еластаза порівняно з контролем зменшувалося (63,8; 258,4 відповідно).

Молочнокислий ацидоз вважається більш фізіологічним видом порушення кислотно-лужної рівноваги порівняно з гіперхлоремічним ацидозом. Відомо, що молочнокислий ацидоз досить часто виникає в процесі життєдіяльності організму і може бути наслідком фізичного навантаження, гіпоксії, голодування. Показники еластазної активності збігаються за напрям-

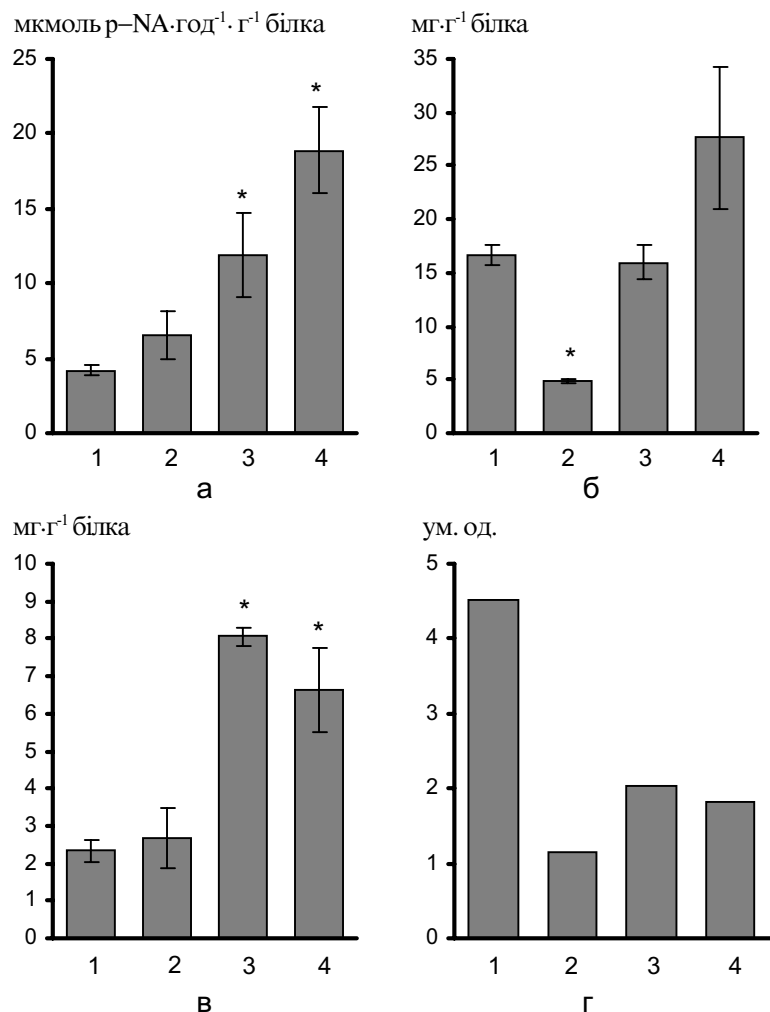


Рис. 1. Активність еластази - а, вміст α<sub>2</sub>-макроглобуліну - б, α<sub>1</sub>-інгібітора протеїназ - в та відношення інгібітори/еластаза - г у гомогенатах аорти щурів в контролі - 1 та за умов моделювання гіпохлоремічного ацидозу - 2, молочнокислого ацидозу - 3, негазового алкалозу - 4. \* P<0,05.

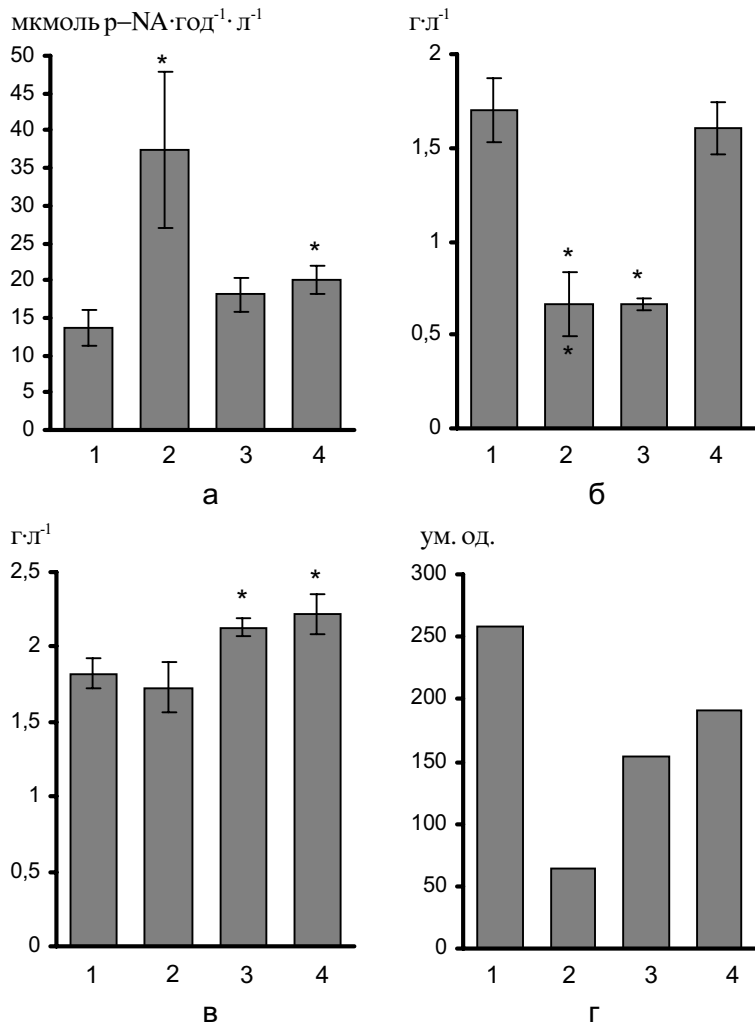


Рис. 2. Активність еластази - а, вміст  $\alpha_2$ -макроглобуліну - б,  $\alpha$ -інгібітора протеїнази - в та відношення інгібітори/еластаза - г у сироватці крові шурів в контролі - 1 та за умов моделювання гіпохлоремічного ацидозу - 2, молочнокислого ацидозу - 3, негазового алкалозу - 4. \*  $P < 0,05$ .

ком з такими при гіперхлоремічному ацидозі, але співвідношення інгібітори / еластаза знижується меншою мірою (див. рис. 1). Це зумовлено тим, що вміст  $\alpha_2$ -М майже не відрізняється від контролю, а вміст  $\alpha_1$ -ІІІ вірогідно збільшується в 3,5 раза ( $8,07 \pm 0,24$ ; у контролі -  $2,33 \pm 0,29$ ;  $P < 0,01$ ). Еластазна активність теж вірогідно підвищується в 2,8 раза ( $P < 0,01$ ).

При моделюванні алкалозу активність еластази вірогідно підвищується, навіть біль-

шою мірою, ніж при відтворенні різних видів ацидозу. У 4,5 раза її активність порівняно з контролем;  $P < 0,0001$ . Слід відзначити збільшення вмісту  $\alpha_2$ -М у гомогенатах аорти на 65% ( $P > 0,05$ ) порівняно з контролем. При ацидозі його вміст зменшувався. Вміст іншого інгібітора еластази -  $\alpha_1$ -ІІІ - в аорті у разі алкалозу також збільшувався (у 2,8 раза порівняно з контролем;  $P < 0,001$ ). Проте співвідношення інгібітори/еластаза знижувалося так само, як і при ацидозі, що свідчить про активацію еластолізу в судинній стінці (1,81 у досліді та 4,52 у контролі).

Ймовірно, у сироватці крові відбуваються певні зміни при введенні молочної кислоти. Порівняно з гіперхлоремічним ацидозом активність еластази вірогідно не відрізнялася від контролю. Вміст  $\alpha_2$ -М істотно знижувався ( $P < 0,05$ ), а вміст  $\alpha_1$ -ІІІ, навпаки, збільшувався порівняно з контрольним значенням. Внаслідок цих змін коефіцієнт інгібітори/еластаза зменшувався, при тому не так значно, як при моде-

люванні ацидозу за допомогою амонію хлориду.

При алкалозі, як і при ацидозі, спостерігається вірогідне збільшення активності еластази - в 1,5 раза. Зміни вмісту  $\alpha_2$ -М нагадували такі в гомогенатах аорти - його вміст не відрізнявся від контролю, тоді як при обох видах ацидозу він значно зменшувався. Вміст  $\alpha_1$ -ІІІ істотно збільшувався порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ). Співвідношення інгібітори/еластаза зменшувалося як і за умов ацидозу.

Таким чином, як свідчать наші результати як при ацидозі, так і при алкалозі спостерігається зниження коефіцієнта інгібітори/еластаза. Це є характерним для тканин аорти сироватки крові. Якщо підвищення активності протеолітичних ферментів при різних видах ацидозу є очікуваним і досить добре узгоджується з літературними даними, то вищевказані порушення при алкалозі є несподіваними. Вони потребують спеціального аналізу.

Зазначені зміни балансу між протеолітичними ферментами та їх інгібіторами можна пояснити тим, що при алкалозі та ацидозі відбувається ушкодження клітин крові та тканин аорти. Внаслідок загибелі останніх виділяються лізосомні ферменти та виникає вторинна альтерація через підвищення активності протеолізу.

Іншим поясненням порушення рівноваги в еластолітичній системі за умов проведених досліджень може бути те, що при алкалозі зменшується синтез адренкортикотропного гормону та глюкокортикоїдів у наднирникових залозах [4]. Глюкокортикоїди, як відомо, здатні пригнічувати активність нейтрофілів, стабілізують їх мембрани та попереджують викид лізосомальних ферментів [9, 14]. Можливе зниження вмісту кортикостероїдів у разі алкалозу спричинятиме підвищення активності еластази нейтрофілів у крові та еластаз іншого клітинного походження в аорті щурів за рахунок викиду цих ферментів активованими клітинами.

Як при молочнокислому, так і при гіперхлоремічному ацидозі у сироватці крові спостерігається вірогідне зменшення вмісту  $\alpha_2$ -M (а при гіперхлоремічному ацидозі і в аорті), що теж може пояснюватися впливом кортикостероїдів, які пригнічують синтез протеїнів у печінці. При алкалозі зазначених змін не спостерігалось, навпаки, вміст інгібіторів залишався в межах норми, або навіть збільшувався.

Безумовно, описані зміни у зазначеній протеолітичній системі свідчать про більш складний характер взаємовідносин порушень кислотно-лужної рівноваги та протеолітичних систем організму, що зумовлює необхідність проведення подальших досліджень.

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

## **CHANGES IN THE ELASTOLYTIC SYSTEM OF BLOOD SERUM AND TISSUE OF AORTA ASSOCIATED WITH ACID-BASE IMBALANCE**

In experiments on the acid-base imbalance modelling (acidosis induced with either lactate or ammonium chloride alkalosis induced with sodium hydrocarbonate) in rats, there were studied elastase activity, alpha-2-macroglobulin and alpha-1 proteinase inhibitor contents in blood serum and tissues of the aorta. The results obtained indicated that, in the models of both acidosis and alkalosis an disbalance between elastase and its inhibitors was observed. However, in  $\text{NH}_4\text{CL}$ -acidosis in homogenates of aorta the inhibitors/elastase coefficient decreased at the expense of a reduction in contents of alpha-2-macroglobulin, while in lactate-acidosis it only decreased at the expense of an increase in elastase activity. In alkalosis, contents of proteinase inhibitors were even increased, however a substantial increase in elastase activity indicated a reduction in integrative coefficient. Similar changes were observed in blood serum, except elastase activity was considerably elevated in  $\text{NH}_4\text{CL}$ -acidosis and did not change in lactate-acidosis. Thus, an disbalance in the elastolytic system associated with different types of acid-base imbalance can promote the destruction of elastic fibers of aorta, which is considered as one of initial mechanisms in pathogenesis of arteriosclerosis.

*A.A. Bogomoletz National Medical University  
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev*

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. - К.: Здоров'я, 1988. - 198 с.
2. Жалко-Титаренко В.Ф. Водно-электролитный обмен и кислотно-основное состояние в норме и при патологии. - К.: Здоров'я, 1989. - 199 с.
3. 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.
4. Кришталь М.В. Нейро-гуморальна регуляція компенсаторних реакцій нирок при метаболічному ацидозі: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - К., 1994. - 43 с.
5. 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, N 6. - P.1447-1453.
6. Ballmer P.E., Imoberdorf R. Influence of acidosis on protein metabolism // Nutrition. - 1995. - 11, N 5. - P.462-468.
  7. Balo J. Die mit ammonium-hydroxydvergiftung erzeugbare experimentelle arteriosclerose // Frankfurt. Zschr. f. Path. - 1938. - 52. - P. 205-220.
  8. Brus F., van Oeveren W., Okken A., Oetomo S.B. Number and activation of circulating polymorphonuclear leukocytes and platelets are associated with neonatal respiratory distress syndrome severity // Pediatrics. - 1997. - 99, N 5. - P.672-680.
  9. England B.K., Jurkovitz C. Effect of glucocorticoids and extracellular pH on protein metabolism in cultured cells // Miner. Electrolyte Metab. - 1992. - 18, № 2. - P. 316-319.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. May R.C., Masud T., Logue B. et al. Metabolic acidosis accelerates whole body protein degradation and leucine oxidation by a glucocorticoid-dependent mechanism // Miner. Electrolyte Metab. - 1992. - 18, № 2-5. - P.245-249.
  15. Kunisaki M., Ayukawa K., Oyamada C., Ogawa S. A case of non-insulin-dependent diabetes mellitus associated with diabetic ketoacidosis after the onset of hyperlipidemia and acute pancreatitis following alcohol abuse // Fukuoka Igaku Zasshi. - 1991. - 82, № 8. - P.464-466.
  16. Tizianello A. Muscle protein turnover in chronic renal failure patients with metabolic acidosis or normal acid-base balance // Miner. Electrolyte Metab. - 1996. - 22, № 1-3. - 58-61.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О.Богомольця  
М-во охорони здоров'я України, Київ*

*Матеріал надійшов  
до редакції 15.12.2000*