

Л. М. Самохіна, В. В. Єфімов, П. М. Зубов, В. І. Блажко ЕЛАСАЗИ, КАТЕПСИН G У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНИМ ОБСТРУКТИВНИМ ЗАХВОРЮВАННЯМ ЛЕГЕНЬ

Інститут терапії ім. Л. Т. Малої АМН України

На сьогодні серед найбільш актуальних науково-практичних проблем в галузі хронічних обструктивних захворювань легень (ХОЗЛ) є дослідження механізмів запалення та їх контроль [11]. Відомо, що ХОЗЛ характеризується обмеженням швидкості повітряного потоку, яке є прогресуючим і пов'язано з патологічною запальною відповіддю легень на дію інгаляційних патогенних часток або газів [1]. Запальні зміни, які спричинені патологічною дією інгаляційних пошкоджуючих факторів, ведуть до змін в стінці бронхіального дерева, паренхимі легень, легневих судинах.

У патогенез ХОЗЛ залучені в основному макрофаги і нейтрофіли, що пов'язано з розвитком оксидативного стресу, який надає захворюванню системний характер. Розвиток оксидативного стресу може бути спричинений різноманітними неорганічними сполуками, що містяться в промислових викидах в атмосферу і мають шкідливу дію на людей. Ця їхня дія значною мірою базується на здатності ксенобіотиків викликати утворення активних метаболітів кисню та обумовлювати пошкодження біомолекул [14]. В результаті пошкодження циркулюючі макрофаги і моноцити мігрують в ушкоджені місця, активуються і виділяють прозапальні цитокіни [16]. Ці медіатори локально підвищують проникність судин, стимулюють ендотеліальну адгезію, активацію і міграцію нейтрофілів [17, 19, 20]. Нейтрофіли володіють набором гідролітичних ферментів, що діють на всі структурні елементи поверхні клітин та екстрацелюлярного матриксу, серед яких протеолітичні — еластаза, катепсин G найбільш здатні до деструкції тканин [2]. Еластаза і катепсин G, які вивільняються поліморфноядерними лейкоцитами, мають високий позитивний заряд і їх катіонна природа може спричиняти пошкодження тканин за рахунок зміни заряду клітинної поверхні або збільшення зв'язування з мембранами клітин, компонентами позаклітинного матриксу.

Спроможністю експресувати еластазу володіють і інші клітини, наприклад, панкреотичні екзокриноцити, тромбоцити, гладеньком'язові клітини (ГМК), ендотеліоцити, фібробласти та ін. [3]. Ідентифіковані серінова еластаза ГМК, нейтрофілів, тромбоцитів, клітин підшлункової залози; металоеластаза макрофагів; тіолова еластаза ендотеліального походження. Для функціонування судинної стінки важливе значення має серінова еластаза ГМК, металоеластаза макрофагів і тіолова або цистеїнова еластаза ендотеліоцитів.

Слід також зазначити, що катепсин G окрім деструктивної дії може приймати участь в утворенні вазоконстрикторного пептиду ангіотензину II (АII), тому дослідження катепсину G бажано проводити на фоні інших нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), в тому числі хімази, тоніну, що здатні розщеплювати АI та/або ангіотензиноген до АII [10].

Регуляція активності еластаз, катепсину G відбувається за участю α -1-ІП.

Мета роботи — вивчення ролі еластаз різного походження, НТПП, катепсину G, α -1-інгібітор протеїназ (α -1-ІП) у патогенезі ХОЗЛ.

Обстежено 20 хворих ХОЗЛ, з них 10 чоловіків і 10 жінок, середній вік ($51,5 \pm 1,9$) років. Контрольна група — 16 здорових осіб, з них 9 жінок, 7 чоловіків, середній вік — ($34,8 \pm 1,9$) рр.

Досліджували до лікування активність НТПП, еластази, ендотеліальної еластази, металоеластази і еластазоінгібіторну активність α -1-ІП в сироватці крові високочутливим (10^{-9} – 10^{-10} г) ферментативним методом і концентрацію катепсину G — імуноферментним [4, 5, 6, 7, 8].

Принцип ферментативного методу засновано на використанні в якості субстрату протеолітичної реакції імібілізованого на поверхні полістиролу маркерного ферменту (пероксидаза хрому), який наперед кон'югували із субстратним білком.

Для оцінки активності НТПП перед проведенням протеолітичної реакції пригнічували активність трипсиноподібних ферментів додаванням 1:1 за об'ємом 0,01 мкг/мл соєвого інгібітору трипсину (СІТ). В якості субстрату протеолітичної реакції використовували протамінсульфат.

Для оцінки еластази субстратом служив Ala-Ala, у якості контрольних зразків використовували еластазу активністю від 0,0005 до 0,5 Од. /мл.

Для визначення активності ендотеліальної еластази (тіолова, цистеїнова) перед проведенням протеолітичної реакції окремо на титрувальній дошці проводили реакцію пригнічення активності серінової нейтрофільної еластази та металоеластази додаванням 1:1 за об'ємом суміші 2-х інгібіторів, а саме: фенілсульфонілфториду та етилендіамінтетраацетату (ЕДТА), інкубували 5 хв при 37 °С.

Для визначення активності металоеластази окремо на титрувальній дошці проводили реакцію пригнічення активності нейтрофільної і ендотеліальної еластази додаванням 1:1 за об'ємом фенілсульфонілфториду та моноіодацетату, інкубували 5 хв при 37 °С.

Для визначення еластазоінгібіторної активності α -1-інгібітора протеїназ перед протеолітичною реакцією окремо проводили реакцію зв'язування інгібітору з еластазою 0,5 Од. /мл протягом 15 хв при 20 °С.

Після проведення протеолітичної реакції визначали залишкову активність маркерного ферменту за допомогою фотометра-аналізатора імуноферментного аналізу Humanreader №2106-1709 фірми "Human" (Німеччина).

У дослідженнях використовували фенілметилсульфонілфлюорид, моноіодацетат, СІТ, протамінсульфат, катепсин G, антитіла проти катепсину G людини фірми "ICN" (США), полістиролові плашки Linbro (США), Ala-Ala фірми Fluka, пероксидазу хрому, еластазу, ЕДТА (Росія).

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

Результати й обговорення

Досліджена активність НТПП є сумарною активністю ферментів утворення АII, саме хімази, тоніну (має і трипсин-, і хімотрипсиноподібну активність), також калікреїну

III або простатспецифічного антигену та ін. без катепсину G. Враховуючи можливість впливу статі на рівень НТПП був проведений порівняльний аналіз між чоловіками і жінками з обстеженої групи пацієнтів із ХОЗЛ, який не виявив відмінностей. Тому результати дослідження активності еластази, ендотеліальної еластази, металоеластази, катепсину G, НТПП та еластазоінгібіторної активності α -1-ІП в сироватці крові представлені без урахування статі (табл.).

У пацієнтів з ХОЗЛ відзначено зниження активності еластаз різного походження на тлі збільшення концентрації катепсину G (нейтрофільного походження) і еластазоінгібіторної активності α -1-ІП, що може свідчити про вичерпання еластаз та/або пригнічення їхньої активності за участю α -1-ІП, а також про можливе включення катепсину G у розвиток деструктивних процесів унаслідок зниження еластазної активності.

Відзначено, що зміни концентрації катепсину G мають варіабельний характер. У більшості хворих виявлено його зниження (група I) порівняно з контролем, а у окремих хворих — підвищення (група II). Активність НТПП не корелює з відмінним характером змін катепсину G, що може бути доказом раніше зробленого припущення про включення катепсину G у розвиток деструктивних, а не вазоконстрикторних процесів.

Аналіз інших досліджених показників відносно рівня катепсину G дозволив виявити, що активність ендотеліальної еластази вище у хворих II групи, тобто з високим рівнем катепсину G; це вказує на істотний характер деструктивних змін в ендотелії в даній групі.

Еластаза вивільняється з клітин при їхньому руйнуванні безпосередньо в міжклітинний простір, крім того, завдяки активному синтезу й експресії ферменту на поверхні клітин (мембран-асоційована форма еластази) [3]. Зниження активності серінової еластази у всіх обстежених пацієнтів може свідчити про її витрату на руйнування ГМК та ін. при ХОЗЛ. Це може обумовлювати ураження за умови ХОЗЛ не лише легеневої тканини, а й кісткової мускулатури, і при цьому хворий втрачає м'язову масу і силу, а самі міоцити піддаються вираженим дистрофічним змінам [1]. Зазначені зміни призводять до обмеження переносимості фізичного навантаження у пацієнтів із ХОЗЛ через низький анаеробний поріг. При цьому істотно погіршуються показники функції зовнішнього дихання (ФЗД) і газів крові: знижуються швидкісні показники (ОФВ₁ та інш.), може виникнути гіпоксемія і навіть гіперкапнія [11]. Вважають, що гіпоксія індукує втрату ваги [18]; хронічна гіпоксія не має ніякого ефекту на масу тіла, але збільшує гематокрит [15]. Хронічна гіпоксія змінює частоту напруженості в діафрагмі, тому впливає на силу

дихальних м'язів, що призводить до втоми при збільшеній активації м'язів.

Збільшення гіпоксемії при загостренні ХОЗЛ становить найбільшу небезпеку для життя хворих [11]. Адекватний рівень оксигенації ($PaO_2 > 60$ мм рт. ст. чи $SaO_2 > 90\%$), як правило, швидко досягається при неускладнених загостреннях ХОЗЛ, однак при цьому є небезпека безсимптомного розвитку гіперкапнії. Враховуючи, що для ХОЗЛ характерне неухильне прогресування захворювання із загостреннями, які виникають 2–5 разів на рік і частіше, ступінь зниження активності еластази може свідчити про погіршення стану хворого.

Зниження активності металоеластази макрофагів та ендотеліальної еластази може бути обумовлено припиненням активного синтезу та експресії ферменту відповідно на поверхні макрофагів та ендотеліоцитів [3].

Враховуючи, що ХОЗЛ як запальне захворювання характеризується участю макрофагів та нейтрофілів, можна свідчити про активну участь серінової еластази та металоеластази у формуванні патогенезу захворювання на ранніх стадіях, а саме — за умов фагоцитозу із залученням рецепторів до Fc-фрагменту імуноглобулінів і факторів комплементу на поверхні нейтрофілів і макрофагів. Відомо також, що в результаті мікроциркуляторних і клітинних реакцій клітини місцевої тканини — макрофаги і гематогенного походження — нейтрофіли приймають участь у формуванні клітинної частини запального випоту (ексудату). Тому зниження активності еластази, металоеластази в сироватці крові може бути обумовлено видаленням ексудату.

Зростання концентрації катепсину G призводить до руйнування компонентів сполучної тканини судинної стінки, підвищення проникності ендотелію судин, модифікації апобіліків, що входять до складу ліпопротеїдів низької густини (ЛПНГ) і як наслідок — до порушення рецепторного зв'язування останніх і т. д. [2]. ЛПНГ є хемоатрактантами для гранулоцитів і моноцитів, сприяють їхній активації і тим самим провокують підвищення концентрації протеїназ і кисневих радикалів, причетних до ушкодження стінки судин.

Включення у розвиток деструктивних процесів ендотеліальної еластази на фоні високого рівня катепсину G обумовлено, скоріше за все, тим, що спорідненість катепсину G до еластину значно нижча, ніж спорідненість до цього білка еластази [13], зміна активності ендотеліальної еластази може безпосередньо впливати на утворення сполучнотканних білків, зокрема еластину [12].

При тривалості процесів руйнування тканин, судинної стінки (хронічна стадія) відбувається зменшення ресурсів і еластаз, і катепсину G. Це обумовлено тим, що протягом

Таблиця

Активність еластаз, нетрипсиноподібних протеїназ, еластазоінгібіторна активність α -1-інгібітора протеїназ і концентрація катепсину G у сироватці крові пацієнтів з ХОЗЛ

Досліджені групи	Активність еластази, Од. /мл	Активність металоеластази, Од. /мл	Активність ендотеліальної еластази, Од. /мл	Вміст катепсину G, мг/л	Активність нетрипсиноподібних протеїназ, г/л год.	Еластазоінгібіторна активність α -1-ІП, Од. /мл
Контроль n=14	2,982±1,004	3,695±1,037	16,768±2,537	2,793±0,806	0,014±0,002	231,5±0,9
ХОЗЛ n=20	0,351±0,044**	0,807±0,171**	0,343±0,086***	93,548±54,886	0,022±0,007	245,1±1,4***
I група n=12	0,345±0,062*	0,846±0,256*	0,163±0,034***	0,248±0,055**	0,013±0,001	246,5±0,8***
II група n=8	0,361±0,067***	0,747±0,209***	0,612±0,174***	233,5±125,6*•	0,034±0,017	242,9±3,2***

Примітка тут і надалі: *, **, ***, *, **, *** — зміни вірогідні порівняно з контролем, з групою I ($p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$, відповідно).

розвитку стрес-реакції організму та формування патологічного стану спостерігають спочатку активацію, потім — пригнічення (зниження) активності протеїназ, у тому числі еластаз, катепсину G [9]. Вказані зміни відбуваються на фоні зменшення, а потім зростання активності інгібіторів, зокрема α -1-ІП. При тривалому підвищенні рівня α -1-ІП відносно норми (хронічна стадія) спостерігається зростання активності протеїназ, яке не перевищує контрольний рівень.

Висновки

1. ХОЗЛ характеризується зниженням активності еластаз різного походження та зростанням еластазоінгібіторної активності α -1-ІП, що обумовлено розвитком запального процесу, деструктивних змін тканин та може призводити до втрати м'язової ваги та сили, погіршення ФЗД, гіпоксемії.

2. Зростання концентрації катепсину G у окремих хворих свідчить про суттєвий розвиток та/або прогресування деструкції клітин, тканин, органів.

3. Кореляція зростання концентрації катепсину G та активності ендотеліальної еластази вказує на наявність локальних деструктивних змін в ендотелії судин і обумовлена, скоріше за все, нижчою спорідненістю катепсину G до еластину порівняно з еластазою.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Белевский А. С.* Глобальная инициатива по ХОБЛ — пересмотр 2003 г. // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. — 2003. — №4. — С. 28–30.
2. *Биохимические и клинические аспекты участия гранулоцитов и их протеиназ в поражении стенки сосудов* / Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Архакова И. А. и др. // Тер. архив. — 1996. — № 5. — С. 78–80.
3. *Досенко В. Е.* Определение различных форм эластазы в аорте при экспериментальном атеросклерозе // Лаб. диагностика. — 1998. — № 1. — С. 24.
4. Пат. № 66517А Україна. Набір для визначення активності металоеластази / Самохіна Л. М. // Офіційний бюлетень "Промислова власність". — 2004. — №5. Укрпатент. — Опубл. : 17. 05. 2004 р. — 6 с.
5. Пат. №44066 Україна. Набір для визначення концентрації катепсину G в біологічних рідинах / Самохіна Л. М., Кравченко Н. О., Максимова Н. А. // Офіційний бюлетень "Промислова власність". — 2004. — №5. Укрпатент. — Опубл. : 17. 05. 2004 р. — 6 с.
6. Пат. №45068 Україна. Набір для визначення активності ендотеліальної еластази в біологічних рідинах. / Самохіна Л. М., Максимова Н. А. // Офіційний бюлетень "Промислова власність". — 2004. — №6. Укрпатент. — Опубл. 15. 06. 2004 р. — 6 с.
7. Пат. №72346 Україна. Набір для визначення еластазоінгібіторної активності α -1-інгібітору протеїназ в біологічних рідинах / Самохіна Л. М. // Офіційний бюлетень "Промислова власність". — 2005. — №2. Укрпатент. — Опубл. 15. 02. 2005 р. — 6 с.
8. Пат. №72656 Україна. Набір для визначення активності нетрипсиноподібних протеїназ в біологічних рідинах / Самохіна Л. М. // Офіційний бюлетень "Промислова власність". — 2005. — №3. Укрпатент. — Опубл. 15. 03. 2005 р. — 6 с.
9. *Самохіна Л. М., Стародуб Н. Ф.* Активність протеїназ и α -1-інгібітора протеїназ при холодострессе у крыс // Укр. биохим. журн. — 1993. — Т. 65, №5. — С. 41–46.
10. *Химотрипсиноподобные* протеиназы и их роль в патогенезе артериальной гипертензии. / Белова Л. А., Оглоблина О. Г., Чихладзе Н. М. и др. // Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии. — Санкт-Петербург. — 1998. — Т. 1. — С. 176–179.
11. *Шмелев Е. И.* ХОБЛ: ключевые проблемы // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. — 2003. — №2. — С. 5–9.
12. *Arterial vasodilation and vascular connective tissue changes in spontaneously hypertensive rats.* / Tsoporis J., Keeley F. W., Lee R. M.,

Leenen F. H. // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 1998. — Vol. 31, №6. — P. 960–962.

13. *Chertov O., Ueda H., Xu L. L.* Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. // J. Exp. Med. — 1997. — Vol. 186, №5. — P. 739–747.
14. *Kelly S. A., Havrilla C. M., Brady T. C.* Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems // Envir. Health Perspect. — 1998. — Vol. 106, №7. — P. 375–385.
15. *Khoury E. R., O'Halloran K., Bradford A.* Effects of chronic hypobaric hypoxia on contractile properties of rat sternohyoid and diaphragm muscles // Clin Exp Pharmacol Physiol. — 2003. — Vol. 30, №8. — P. 551–554.
16. *Luster M. L.* Inflammation, tumour necrosis factor, and toxicology // Envir. Health Perspect. — 1998. — Vol. 106, №9. — P. 418–419.
17. *Hubbard A. K., Rothlein R.* Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades // Free Radic. Biol. Med. — 2000. — Vol. 28, №9 — P. 1379–1386.
18. *Raff H.* Total and active ghrelin in developing rats during hypoxia // Endocrine. — 2003. — Vol. 21, №2. — P. 159–162.
19. *Vaday G. G., Lider O.* Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation // J. Leukoc. Biol. — 2000. — Vol. 67, №2. — P. 149–159.
20. *Verhasselt VOL., Goldman M., Willems F.* Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells // Eur. J. Immunol. — 1998. — Vol. 28, №11 — P. 3886–3890.

ЕЛАСТАЗИ, КАТЕПСИН G У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНИМ ОБСТРУКТИВНИМ ЗАХВОРЮВАННЯМ ЛЕГЕНЬ

Л. М. Самохіна, В. В. Єфімов, П. М. Зубов, В. І. Блажко

Резюме

Вивчали роль еластаз, нетрипсиноподібних протеїназ, α -1-інгібітору протеїназ (α -1-ІП) (ферментативним методом), катепсину G (імуноферментним методом) у патогенезі хронічного обструктивного захворювання легень. Виявлено зниження активності еластаз і підвищення еластазоінгібіторної активності α -1-ІП, що обумовлено розвитком запального процесу, деструктивних змін у тканинах і може призводити до втрати м'язової маси і сили, погіршення функції зовнішнього дихання, гіпоксемії. Зростання концентрації катепсину G у окремих хворих свідчить про істотний розвиток і/чи прогресування деструкції клітин, тканин, органів. Кореляція зростання рівнів катепсину G і ендотеліальної еластази вказує на наявність локальних деструктивних змін в ендотелії судин і обумовлена, швидше за все, більшою спорідненістю катепсину G до еластину в порівнянні з еластазою.

ELASTASES, CATHEPSIN G IN THE PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

L. M. Samokhina, V. V. Efimov, P. M. Zubov, V. I. Blazhko

Summary

A role of elastases, non-trypsin like proteinase, alpha-1-proteinase inhibitor (alpha-1-PI) (enzyme assay), cathepsin G (immunoenzyme assay) was studied in chronic obstructive pulmonary diseases patients. The decrease of elastase activity and increase of alpha-1-PI elastase inhibitory activity, caused by an inflammatory process and destructive changes in tissues, resulted in loss of muscular weight and force, deterioration of pulmonary ventilation and hypoxia. The increase of cathepsin G concentration in the separate patients confirmed a development and/or progressing of cells, tissues and organ destruction. The correlation of increase of cathepsin G and endothelial elastase levels pointed on the presence of local destructive changes in endothelium of vessels and was caused, most likely, by lower affinity of cathepsin G to elastine in comparison with elastase.