

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Лаптева Е. А. (e.lapteva@tut.by)

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Выявлены особенности регуляции протеолиза у пациентов с разной степенью тяжести ХОБЛ. В исследовании проведено изучение активности трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов в крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) пациентов с ХОБЛ. Объектом данного исследования явились плазма крови 10 доноров и 70 пациентов с ХОБЛ: 10 – с легким течением заболевания и по 20 – со среднетяжелым, тяжелым и крайне тяжелым. В плазме крови определяли активность трипсиноподобных протеиназ (ТпА) и их ингибиторов – α 1-ИП и α 2-МГ. Установлено, что состояние протеолитической составляющей крови и БАЛЖ, в частности трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов, общей протеолитической активности крови и БАЛЖ пациентов с ХОБЛ может иметь как диагностическое, так и прогностическое значение.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, протеазы, ингибиторы протеаз

Изучение протеолиза и механизма его регуляции является важным для решения вопросов прогрессирования хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), поскольку при данной патологии происходит избыточная активация протеолиза, что является значимым патогенетическим звеном в развитии деструктивных и воспалительных процессов [4, 5]. Исходя из этого, представляет интерес изучение состояния системы протеолиза у пациентов с ХОБЛ с учетом стадии прогрессирования и фенотипа заболевания.

Регуляция протеолиза осуществляется несколькими путями, наиболее важным из которых является взаимодействие со специфическими белками – ингибиторами, которые контролируют активность протеолитических ферментов, участвующих в иммунных реакциях, образовании и распаде физиологически активных белков и пептидов. Наиболее значимыми среди большого количества белков-ингибиторов являются α 1-ингибитор протеаз (α 1-ИП) и α 2-макроглобулин (α 2-МГ). α 1-ИП осуществляет более 90% протеолитической функции крови, взаимодействие его с протеиназами гранулоцитов происходит мгновенно. α 2-МГ имеет несколько иной механизм антипротеолитического действия и представляет собой «ловушку» для протеаз. В отличие от классического механизма, протеиназа, находясь в комплексе с α 2-МГ, сохраняет протеолитическую активность и способность гидролизовать низкомолекулярные субстраты. Однако если период полужизни протеиназы и α 2-МГ в отдельности составляет около 1 суток, то в комплексе этот период составляет около 1 минуты [1, 2, 3, 5].

По литературным данным, как α 1-ИП, так и α 2-МГ участвуют в развитии воспалительных (в том числе инфекционных) процессов при ХОБЛ, являются белками острой фазы и могут быть использованы в диагностических и прогностических целях [1, 2, 3, 5].

Цель исследования – выявление особенностей регуляции протеолиза у пациентов с разной степенью тяжести ХОБЛ.

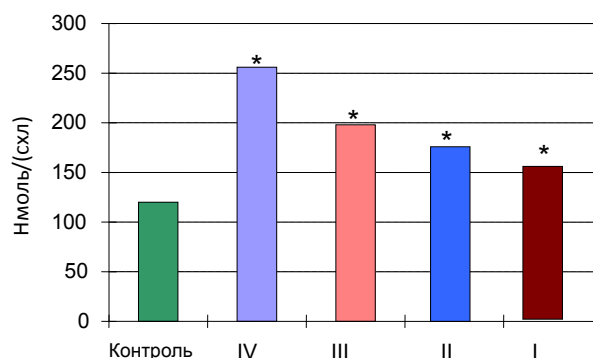
Материалы и методы

В плазме крови определяли активность трипсиноподобных протеиназ (ТпА) и их ингибиторов – α 1-ИП и α 2-МГ у 70 пациентов с ХОБЛ: 10 – с легким течением заболевания и по 20 – со среднетяжелым, тяжелым и крайне тяжелым, а также у 10 доноров. Протеолитическую активность плазмы крови определяли методом лизиса белков-субстратов в тонком слое агарового геля, используя в качестве

растворителя 0,05М трис-НСLбуфер pH 7,4. Учитывая высокий уровень белков-ингибиторов в плазме крови, проводились исследования лизиса желатина в зависимости от разведения образцов плазмы 0,15 М раствором NaCl. Проведено исследование влияния на желатинолитическую активность ионов кальция (Ca^{2+}) (0,001М) и АТФ (0,001М).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что по сравнению с плазмой крови, полученной от доноров (контроль), активность ТпА была достоверно выше в плазме крови пациентов с ХОБЛ средней тяжести, а также тяжелого и крайне тяжелого течения (рис. 1).



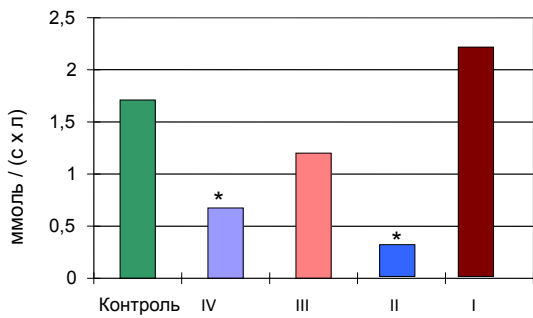
Примечание: * - достоверные различия ($p < 0,001$) по сравнению с контролем

Рисунок 1. – Изменение активности ТпА при разных стадиях ХОБЛ

У пациентов с крайне тяжелой ХОБЛ бронхитического фенотипа увеличение составило 69,3%, с тяжелой – 62,0%, со среднетяжелой – 21,3% и с легкой ХОБЛ – 18,4%. При ХОБЛ с эмфизематозным фенотипом крайне тяжелого течения увеличение составило 112%; при тяжелом течении – 65%; при средней тяжести заболевания – 46,7%; при легкой – 27,5%, что свидетельствует о наибольшей активности трипсиноподобных протеиназ при тяжелых формах ХОБЛ с эмфизематозным фенотипом заболевания.

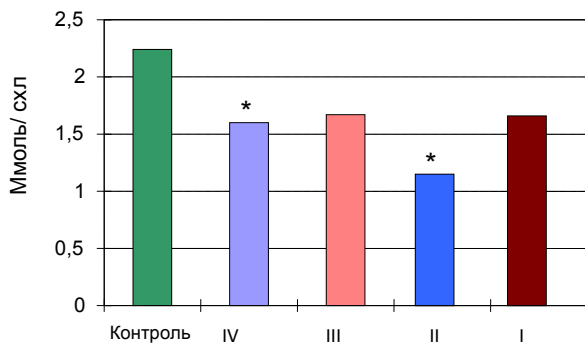
Уровни активности ингибиторов трипсиноподобных протеиназ представлены на рис. 2, 3.

Наибольшее угнетение активности как 1-ИП, так и α 2-МГ наблюдалось при среднетяжелом эмфизематозном фенотипе ХОБЛ – на 83% и 49%, соответ-



Примечание: * - достоверные различия ($p < 0,001$) по сравнению с контролем

Рисунок 2. – Изменение активности $\alpha 1$ -ИП при разных степенях тяжести ХОБЛ



Примечание: * - достоверные различия ($p < 0,001$) по сравнению с контролем

Рисунок 3. – Изменение активности $\alpha 2$ -МГ при разных степенях тяжести ХОБЛ

ственно. Снижение ингибиторной активности при крайней степени тяжести было менее выраженным и составило для $\alpha 1$ -ИП 61% и $\alpha 2$ -МГ 29%. Отмечена тенденция к уменьшению ингибиторной активности плазмы и при тяжелом течении – на 25-30%, однако изменения не были статистически достоверными. При легкой степени тяжести $\alpha 1$ -ИП-активность была выше по сравнению с контролем на 28%. При бронхитическом фенотипе ХОБЛ также зафиксировано снижение активности как $\alpha 1$ -ИП, так и $\alpha 2$ -МГ, которое, однако, было менее выражено, чем при эмфизематозном. Наибольшее угнетение активности ингибиторов $\alpha 1$ -ИП и $\alpha 2$ -МГ выявлено на этапе крайне тяжелого течения – на 63,4% и 38,8%, при тяжелом течении снижения составило 13,5% и 17,2%, соответственно. На более легких этапах заболевания достоверных различий по уровню ингибиторов протеаз с контролем не получено ($p > 0,05$).

Выявленные факты указывают на зависимость уровня ТпА и активности белков-ингибиторов, в силу которой при почти полном истощении активности $\alpha 1$ -ингибитора протеиназа общая трипсиноподобная активность плазмы крови нарастает. Вместе с тем при среднетяжелом течении ХОБЛ, при значительном угнетении активности ингибиторов существенного повышения ТпА не наблюдается.

Полученные результаты свидетельствуют, что состояние исследуемых показателей может являться определяющим при прогнозировании степени прогрессирования ХОБЛ. Однако эти факты также дают основание полагать, что уровень про-

теолитической активности плазмы контролируется более сложным механизмом, чем уровень активности двух белков-ингибиторов. В силу этих обстоятельств целесообразным подходом является изучение в качестве интегрального показателя протеолитической активности плазмы крови по белковому субстрату, а также изменения ее при добавлении *in vitro* ионов Ca^{2+} и АТФ в качестве зондов.

В ряде исследований плазмы доноров было продемонстрировано, что неразведенные образцы плазмы не расщепляют сывороточный альбумин, казеин, гемоглобин, фибриноген, но способны расщеплять желатин. Учитывая высокий уровень белков-ингибиторов в плазме крови, проведены исследования лизиса желатина в зависимости от разведения образцов плазмы. Проведено также исследование влияния на желатинолитическую активность ионов кальция (Ca^{2+}) и АТФ.

Методом лизиса желатина в тонком слое агарового геля показаны различия эффекта ионов Ca^{2+} и АТФ на желатинолитическую активность плазмы крови у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести в сравнении с контролем.

Добавление Ca^{2+} (10-6-10-3 М) к плазме крови доноров обнаруживает динамику желатинолитической активности четырех типов (рис. 4, А):

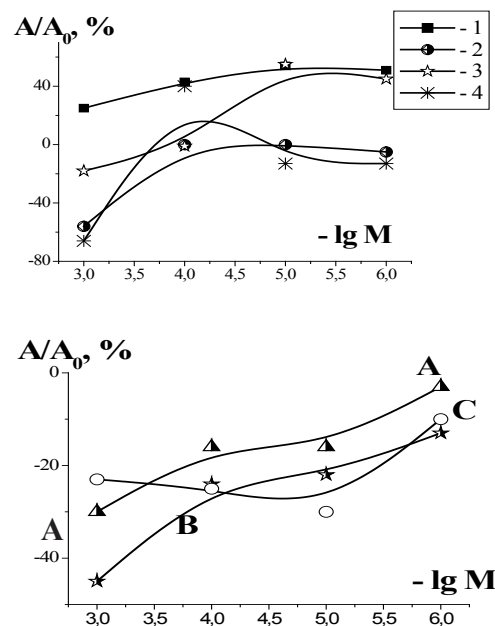
1 – активность возрастала во всем диапазоне концентраций Ca^{2+} на 20-40%;

2 – активность угнеталась при максимальной концентрации ионов на 60%;

3 – активность плазмы возрастала на 40% при более низких концентрациях ионов, но угнеталась на 20% при 10-3 М;

4 – желатинолитическая активность угнеталась на 20% в диапазоне концентраций Ca^{2+} 10-6-10-5 М, возросла на 40% при концентрации 10-4 М и угнеталась на 70% при максимальной концентрации.

При исследовании плазмы крови пациентов ни в одном случае из 9 не наблюдали увеличения желатинолитической активности (рис. 4, Б).



Приложение: А – доноров, Б – пациентов

Рисунок 4. – Типы изменения желатинолитической активности плазмы крови в присутствии Ca^{2+}

Как правило, с увеличением концентрации Ca^{2+} она угнеталась. Однако прослеживалась зависимость трех видов: А – активность угнеталась в диапазоне концентраций 10-5-10-3 М Ca^{2+} на 20-30%; В – угнетение наблюдалось на 20 - 45% во всем концентрационном диапазоне; С – желатинолитическая активность плазмы крови подавлялась на 22-33% в диапазоне концентраций 10-5-10-3 М, однако зависимость отличалась от типа А. Здесь следует отметить, что изменения типа 2 желатинолитической активности плазмы крови доноров напоминают таковые типа В пациентов. Этот аспект нуждается в дальнейшем изучении.

Учитывая, что нарушения функционирования протеолитического звена вызывают или сопровождают развитие целого ряда патологических процессов, совершенствование ранней и дифференциальной диагностики ХОБЛ, обоснование рациональных приемов патогенетической терапии возможны только при условии раскрытия новых закономерностей регуляции протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях. В связи с этим исследование состояния протеолитической составляющей крови, в частности трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов, общей протеолитической активности крови пациентов с ХОБЛ на разных этапах прогрессирования, несомненно, может иметь как диагностическое, так и прогностическое значение.

Данные изменения носили разноплановый характер не только у обследованных пациентов с ХОБЛ с разной степенью тяжести заболевания, но также при исследовании образцов плазмы доноров.

В целом усредненные по 70 образцам плазмы крови пациентов с ХОБЛ изменения желатинолитической активности при добавлении АТФ в концентрации 10-5-10-3 М не превышали 15% (рис. 5).

Однако эта картина менялась при разведении плазмы крови: при минимальной концентрации нуклеотида наблюдалось значимое снижение уровня активности. Это может быть следствием того, что при разведении плазмы изменяются, во-первых, соотношения белок субстрат-протеиназа, а во-вторых – характер баланса протеиназа-антипротеиназы.

Дополнительно объектом исследований были образцы (n=46) бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Результаты исследования свидетельствовали, что усредненные изменения при максимальной концентрации АТФ (10-2М) выражались в слабом угнетении желатинолитической активности, тогда как при минимальной концентрации нуклеотида (10-4 М) наблюдалось незначительное усиление расщепления желатина на 12% (рис. 6).

Анализ по типу реакции показал, что «индифферентных» к добавлению АТФ образцов – меньшинство (табл.1).

При максимальной концентрации эффектора чаще (50%) встречается угнетение активности в среднем на 25%. При уменьшении концентрации

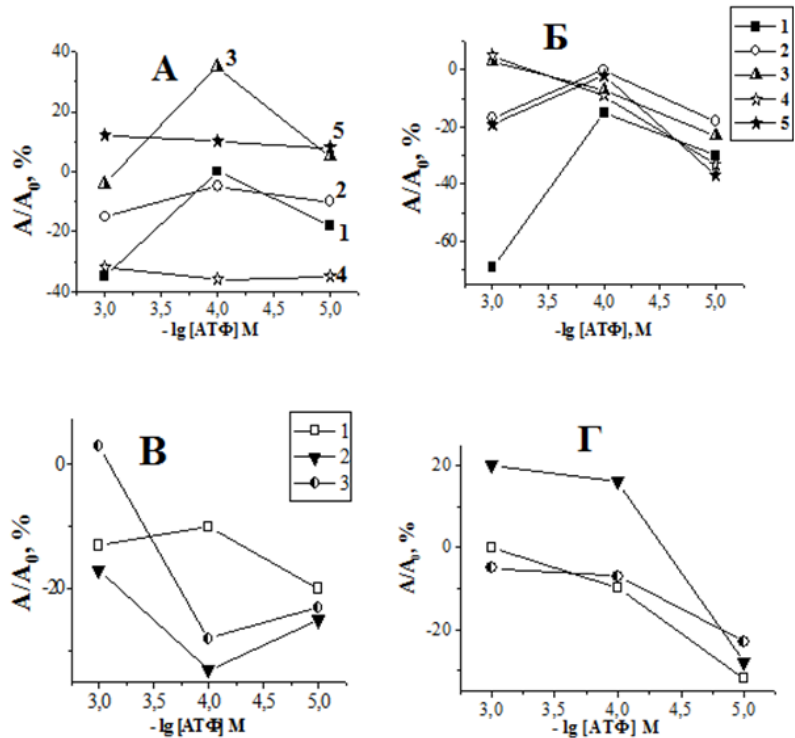
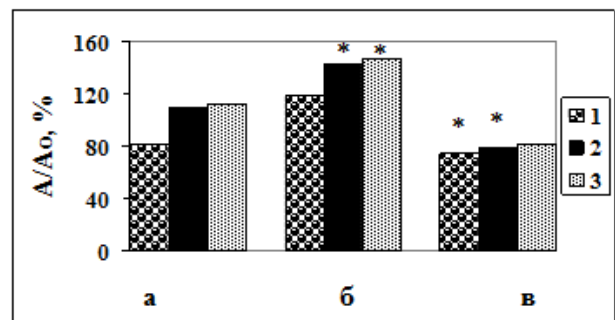


Рисунок 5. – Влияние добавления АТФ к образцам цельной (А, В) и разведенной 1:2 (Б, Г) плазмы крови пациентов с ХОБЛ IV (А, Б) и III стадий (В, Г)



Примечание: а – усредненные результаты, б – по образцам, активируемым АТФ, в – по образцам, ингибируемым АТФ

Рисунок 6. – Влияние добавления АТФ в концентрации 10-2 (1), 10-3 (2) или 10-4 (3) М на желатинолитическую активность БАЛЖ у пациентов с ХОБЛ

Таблица 1. – Распределение количества (n = 46) образцов бронхоальвеолярной лаважной жидкости у пациентов с ХОБЛ по характеру изменений желатинолитической активности при добавлении АТФ

Характер изменений активности, n	Концентрация АТФ, М		
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Изменения отсутствуют (>10%)	14	12	12
Увеличение	13	17	17
Снижение	19	17	17

АТФ на 1-2 порядка распределение количества образцов между ростом и снижением активности одинаково, однако рост активности более выражен и практически достигает 50% в сравнении с контролем.

Исследование картины изменений желатинолитической активности лаважной жидкости у пациентов с крайне тяжелой ХОБЛ и с ХОБЛ средней тяжести также выявило вариабельность индивидуальных картин изменений под влиянием АТФ. Причины тому отчасти те же, что указаны для плазмы крови. Однако для исследования БАЛЖ данная проблема имеет большее значение, – мы полагаем, что для диагностических целей бронхоальвеолярная лаважная жидкость должна быть получена путем использования промывного раствора строго определенного объема и компонентного состава. В противном случае на результатах анализа будут сказываться степень разведения и присутствие соединений, способных изменять протеолитическую активность.

Сопоставление характера влияния Ca^{2+} и АТФ на желатинолитическую активность плазмы крови доноров и пациентов с ХОБЛ позволяет сделать предположение либо о нескольких типах «организации» протеолиза у клинически здоровых людей, либо о наличии у части из них скрытых отклонений от нормы, не выявляемых при обычном лабораторном исследовании. Кроме того, результаты влияния Ca^{2+} и АТФ на желатинолитическую активность плазмы крови демонстрирует сложность ее регуляции, которая вместе с тем не исчерпывается лишь участием двух упомянутых метаболитов.

Литература

1. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2 alpha – III, an index of oxidant stress / D. Pratico [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. – 1998. – Vol.158, № 6. – P. 1709–1714.
2. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency / D.L. Dimeo [et al.] // Thorax. – 2007. – Vol. 62, № 9. – P. 806–813.
3. Exhaled 8-isoprostane as an vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers / P. Montuschi [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. – 2000. – Vol. 162, № 3, pt. 1. – P. 1175–1177.
4. Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease / C. Koechlin [et al.] // Thorax. – 2005. – Vol. 60, № 10. – P. 834–841.
5. Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystis fibrosis sputum / V. Witko-Sarsat [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 20, № 4. – P. 729–736.

Таким образом, в патогенезе ХОБЛ подтверждается участие фактора роста нервов, уровни которого разнонаправленно изменяются при разных стадиях заболевания и в процессе проводимой терапии.

Выводы

1. Наиболее частой реакцией на добавление АТФ было снижение протеолитической активности в анализируемых образцах, тогда как влияние ионов Ca^{2+} , выявило большее разнообразие наблюдаемых реакций.
2. Дисбаланс компонентов системы протеолиза, а также снижение активности $\alpha 1$ -ИП и $\alpha 2$ -МГ является неблагоприятным прогностическим признаком, свидетельствующим о нарастании клеточной дезорганизации и прогрессировании заболевания.
3. Увеличение уровней $\alpha 1$ -ИП и $\alpha 2$ -МГ у пациентов с нетяжелыми стадиями ХОБЛ свидетельствует о стабилизации активности протеиназ за счет достоверного увеличения активности основных ингибиторов протеолиза, что может рассматриваться в качестве одного из критериев диагностики легкого и среднетяжелого течения ХОБЛ.
4. Исследование состояния протеолитической составляющей крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ), в частности трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов, общей протеолитической активности крови и БАЛЖ пациентов с ХОБЛ, может иметь как диагностическое, так и прогностическое значение.

Literatura

1. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2 alpha – III, an index of oxidant stress / D. Pratico [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. – 1998. – Vol.158, № 6. – P. 1709–1714.
2. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency / D.L. Dimeo [et al.] // Thorax. – 2007. – Vol. 62, № 9. – P. 806–813.
3. Exhaled 8-isoprostane as an vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers / P. Montuschi [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. – 2000. – Vol. 162, № 3, pt. 1. – P. 1175–1177.
4. Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease / C. Koechlin [et al.] // Thorax. – 2005. – Vol. 60, № 10. – P. 834–841.
5. Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystis fibrosis sputum / V. Witko-Sarsat [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 20, № 4. – P. 729–736.

STATE OF PROTEOLYSIS SYSTEM IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Lapteva E. A.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Peculiarities of proteolysis regulation in patients with different severity of COPD have been revealed. The activity of trypsin-like proteinases and their inhibitors in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in patients with COPD have been studied. The object of the study was blood plasma of 10 donors and 70 patients with COPD: 10 – with mild disease and 20 – with moderate, severe and advanced stage of the disease. We assessed the activity of trypsin-like proteases (TPA) and their inhibitors $\alpha 1$ -PI and $\alpha 2$ -MG in blood plasma. We found out that the state of the proteolytic component of blood and BALF, trypsin-like proteases and their inhibitors in particular, may have both diagnostic and prognostic value for patients with COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, proteases, protease inhibitors.

Поступила: 28.06.2016

Отрецензирована: 30.06.2016