

Tadeusz MIERZEJEWSKI, Adam KĄDZIOŁKA,
Beata SŁOWIKOWSKA

**Metabolizm błony wewnętrznej aorty świń. Cz. III. Aktywność
proteolityczna homogenatów intymy i medii tętnicy głównej ze zmianami
i bez zmian arteriosklerotycznych**

Метаболизм внутренней оболочки аорты свиней. Ч. III. Протеолитическая активность
гемогенизатов интимальной и медиальной аорт, артериосклерозно измененных
и неизмененных

Metabolism of Intima of the Pig's Aorta. III. Proteolytic Activity of Intima and
of the Media Homogenate Main Aorta with, and without, Arteriosclerotic Changes

Aktywność metaboliczna ściany tętnicy głównej i krwi stanowi przedmiot badań w przypadkach naturalnej oraz doświadczalnie wywołanej arteriosklerozy (4, 6, 9—16, 18, 20). W osoczu u kogutów pozostających na diecie aterogennej obserwowano zmiany aktywności lipolitycznej (11, 12) i aminotransferazowej (9, 10), a konfrontacja aktywności lipolitycznej w wyciągach homogenatów intymy i medii tętnic głównych świń ze zmianami i bez zmian arteriosklerotycznych wykazała różnice statystycznie wysoce istotne (13).

Większą skłonność do zmian miażdżycowych tętnic niż żył przypisał Krik (cyt. za 5) różnicom w ich aktywności enzymatycznej, między innymi katepsyn. Wykazał on, że aktywność proteolityczna w ścianie naczynia żylnego stanowi tylko 20% aktywności spotykanej w ścianie aorty. Patelski i wsp. stwierdzili w ścianie aorty królików i szczurów z doświadczalnie wywołaną arteriosklerozą różnice w aktywności enzymów hydrolizujących estry wyższych kwasów tłuszczowych (15), nie wykazali natomiast różnic w aktywności dehydrogenaz kwasu mlekowego i jabłkowego (16). W związku z tym przypuszczali, że w arteriosklerozie zmiany aktywności enzymów ściany tętnicy głównej dotyczą fermentów o funkcji specyficznej, nie zaś ogólnej aktywności metabolicznej aorty (16).

W arteriosklerozie histopatologiczny obraz zmian wykazuje cechy infiltracyjno-proliferacyjne (3, 17). Infiltracja i proliferacja może powodować zaburzenia w regulacji aktywności proteaz komórkowych lub powstawać w wyniku takiego zaburzenia, ponieważ jakiegokolwiek zaburzenie regulacji tego układu uszkadza w konsekwencji metabolizm komórki. Dlatego kontynuując badania nad metabolizmem błony wewnętrznej aorty świń w niniejszej pracy konfrontowano aktywność proteaz (pH 3,5 i pH 7,4) w homogenatach intymy i medii tętnic głównych — ze zmianami i bez zmian arteriosklerotycznych.

MATERIAŁ I METODY

Od kilkudziesięciu świń rasy białej polskiej, o ciężarze około 100 kg, natychmiast po uboju izolowano odcinki piersiowe i brzuszne aort, przemywano chłodną (+7°C) wodą, rozcinano i osuszano bibułą filtracyjną. Oddzielano błony wewnętrzne, które następnie zamrażano. Wybrano 14 błon wewnętrznych z wyraźnie makroskopowo widocznymi zmianami arteriosklerotycznymi — grupa A, oraz 14 błon wewnętrznych, na których gołym okiem nie stwierdzono zmian stwardnieniowych — grupa Bz. Ocena makroskopową badanych aort weryfikowano histopatologicznie, stosując w preparatach mrożonych barwienie roztworami Sudanów III i czarnego (4).

Zamrożone błony wewnętrzne grup Bz i A rozdrabniano skalpelem w zimnych, umieszczonych w lodzie móździerzach, a następnie ucierano z pyłem szklanym na miążgę, dodając porcjami zimny 0°C 30% roztwór glicerolu w wodzie w stosunku 5 ml 30% glicerolu na 1 g tkanki. Homogenat wirowano w chłodni w temp. +2°C przy 10000 obr./min. przez 15 min. Supernatant bezpośrednio po odwirowaniu użyto do oznaczeń aktywności proteolitycznej (APR) przy pH 3,5 i pH 7,4. APR pH 3,5 oznaczano opierając się na metodzie (2) w następującym układzie: 1 ml supernatantu + 1 ml buforu cytrynianowo (0,1 M) — fosforanowego (0,2 M) pH 3,5 + 1 ml 0,5% roztworu kazeiny. Inkubację prowadzono 20 godzin. Reakcję przerywano dodając do inkubatu 3 ml 10% kwasu tróchlorooctowego (TCA), odstawiano na 20 min. a następnie wirowano. W 1 ml porcjach odbiałzonego, klarownego supernatantu oznaczano na fotometrze firmy Spektol rozpuszczoną w TCA tyrozinę (8). APR pH 3,5 wyrażono w μM tyrozyny/1 g białka wyciągu/1 godz., posługując się następującym wzorem:

$$\text{APR pH 3,5} = \frac{300 \times \mu\text{M tyrozyny w próbce}}{\text{mg białka w 1 ml homogenatu}}$$

APR pH 7,4 oznaczano opierając się na metodzie opisanej przez Bałachowskiego (1) w następującej modyfikacji: 2 ml supernatantu z homogenatu mieszano z 8 ml buforu fosforanowego 0,1 M, pH 7,4. Do mieszaniny dodawano 2 ml czystego chloroformu i wytrząsano energicznie przez 1 min. Po oddzieleniu się warstwy chloroformowej pobierano z nad niej 2 ml płynu do oznaczeń APR pH 7,4. Mieszaninę inkubacyjną stanowiły 2 ml płynu z nad warstwy chloroformowej i 1 ml 0,5% roztworu kazeiny. Czas i temperatura inkubacji, odbiałczanie i oznaczanie produktów reakcji — identyczne jak przy oznaczaniu APR pH 3,5. APR pH 7,4 wyrażono w μM tyrozyny/1 g białka wyciągu/1 godz. przy pomocy wzoru:

$$\text{APR pH 7,4} = \frac{1500 \times \mu\text{M tyrozyny w próbce}}{\text{mg białka w 1 ml homogenatu}}$$

Białko oznaczano metodą Lowry (7). Odczynniki do preparacji, prób i oznaczeń zastosowano czyste p.a. Konfrontację wyników APR pH 3,5 i APR pH 7,4 w grupach A i Bz przeprowadzono testem równości średnich dwóch populacji normalnych (21) i współczynnikiem korelacji Pearsona (19).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki oznaczeń zebrano w tab. 1 i 2. Z danych tab. 1 wynika, że:

1) w badanych homogenatach występowały enzymy katalizujące reakcję proteolizy w pH 7,4, których aktywność można było oznaczyć przez fotometryczny pomiar rozpuszczalnej w TCA tyrozyny,

Tab. 1. APR pH 3,5 i APR pH 7,4 grup A i Bz
APR pH 3,5 and APR pH 7,4 of groups A and Bz

L.p.	APR pH 3,5 w grupie:		L.p.	APR pH 7,4 w grupie:	
	A	Bz		A	Bz
1	3,54	5,41	1	6,60	39,59
2	4,55	4,39	2	7,26	28,76
3	1,75	7,75	3	1,50	42,50
4	2,94	6,17	4	2,19	38,07
5	2,03	5,78	5	1,68	37,32
6	2,36	3,18	6	2,70	23,05
7	3,63	8,95	7	25,87	48,12
8	2,56	4,80	8	11,02	32,59
9	1,96	4,37	9	12,45	18,64
10	1,69	2,79	10	3,42	1,61
11	1,82	3,05	11	0,65	4,25
12	2,09	2,73	12	2,23	4,70
13	2,30	3,84	13	3,50	7,67
14	3,32	5,25	14	1,25	8,89

2) APR pH 3,5 oraz APR pH 7,4 w grupie A wykazywała niższe wartości niż w grupie Bz,

3) APR pH 3,5 była niższa od APR pH 7,4 w homogenatach obu badanych grup,

4) zarówno w grupie A, jak i Bz APR pH 3,5 wykazywała mniejszy rozrzut aktywności od APR pH 7,4.

W tab. 2 przedstawiono obliczone na podstawie wyników zestawionych w tab. 1 wartości średnie i odchylenie standardowe APR pH 3,5 i APR pH 7,4 grup A i Bz. Dane te użyto do obliczeń statystycznych.

Tab. 2. Wartości średnie i odchylenia standardowe: APR pH 3,5 i APR pH 7,4 grup A i Bz
Mean values and standard deviations: APR pH 3,5 and APR pH 7,4 of groups A and Bz

	APR pH 3,5 w grupie:		APR pH 7,4 w grupie:	
	A	Bz	A	Bz
Liczzebność	14	14	14	14
Wartość średnia $\bar{x}$	2,61	4,89	5,88	23,98
Odchylenie standardowe S	0,832	1,78	6,58	15,64

W celu wykazania różnic w APR między grupami A i Bz testem równości średnich (21) obliczono dwukrotnie statystykę V ze wzoru:

$$V = \frac{\frac{\bar{B}_z - \bar{A}}{\sqrt{\frac{S^2_{Bz} - S^2_A}{n}}}}{\quad} \quad \begin{array}{l} \text{dla APR pH 3,5} = V_1 = 4,335 \text{ i} \\ \text{APR pH 7,4} = V_2 = 3,991 \end{array}$$

oraz odpowiednie wartości c : $c_1 = 0,18$ i $c_2 = 0,15$.

Na poziomie istotności $\alpha = 0,005$, przy $v = 13$ stopni swobody, odczytana z tabel (21) wartość krytyczna statystyki V dla $V(c_1; 13; 0,005) = 2,85$, $V(c_2; 13; 0,005) = 2,86$. Ponieważ w obydwu przypadkach (APR pH 3,5; APR pH 7,4) $V \gg V(c; 13; 0,005)$, należy przyjąć, że między grupami A i Bz w teście jednostronnym na poziomie istotności $\alpha = 0,005$ istnieją różnice statystycznie istotne.

Zależność między wartościami APR pH 3,5 i APR pH 7,4 w grupie A oraz grupie Bz wykazano obliczając współczynnik korelacji Pearsona (19) ze wzoru

$$\gamma = \frac{\sum_{i=1}^{14} \frac{x_i y_i}{n} - \bar{x} \cdot \bar{y}}{S(x) \cdot S(y)} \quad \text{w którym } x_i, y_i \text{ przedstawia wartości APR.}$$

Współczynnik korelacji APR pH 3,5 i APR pH 7,4 dla grupy A wynosi $\gamma_A = 0,4012$, dla grupy Bz — $\gamma_{Bz} = 0,8367$.

W celu sprawdzenia istotności współczynnika korelacji zastosowano test istotności (21). Na poziomie istotności $\alpha = 0,005$ i przy 12 stopniach swobody wartość krytyczna współczynnika istotności wynosi $\gamma_o = 0,5324$. Ponieważ $\gamma_A = 0,4012$ nie przekracza wartości granicznej $\gamma_o = 0,5324$, oznacza to brak korelacji między wartościami APR pH 3,5 i APR pH 7,4 w grupie A. Natomiast w grupie Bz współczynnik korelacji wynosi $\gamma_{Bz} = 0,8367$ ($\gamma_o = 0,5324$). W związku z tym pomiędzy wartościami APR pH 3,5 i APR pH 7,4 tej grupy istnieje istotna korelacja.

Proteazy komórkowe uczestniczą w utrzymaniu stanu równowagi dynamicznej między białkami a produktami ich rozpadu oraz wpływają regulująco na różne systemy enzymatyczne poprzez rozkład i inaktywację fermentów (5).

W niniejszej pracy wykazano, że w homogenatach błon wewnętrznych tętnic głównych świń ze zmianami arteriosklerotycznymi (grupa A) i bez takich zmian (grupa Bz) występują statystycznie istotne ($\alpha = 0,005$) różnice w aktywności proteaz komórkowych. Wyższe APR pH 3,5 i APR pH 7,4 oznaczano w homogenatach grupy Bz. Poza tym w grupie Bz wykazano istotną korelację między aktywnością proteaz czynnych w pH 3,5 i pH 7,4, podczas gdy w grupie A korelacja tego typu nie miała miejsca.

Wyniki przeprowadzonych badań nie upoważniają wprowadzić do udzielenia jednoznacznej odpowiedzi — czy stwierdzone różnice i zmiany APR komórkowych w homogenatach błon wewnętrznych tętnic głównych ze zmianami arteriosklerotycznymi powstają pierwotnie, a konsekwencją tych zmian są obserwowane (11–13, 15, 16) zaburzenia systemu enzymatycznego esteraz kwasów tłuszczowych, czy też na skutek zmian istniejących w arteriosklerotycznej tkance proteazy komórkowe hamowane są wtórnie (co nie było

jeszcze badane) przez czynniki toksyczne, czy może ma miejsce znany fakt, że obecność kwasów tłuszczowych zwiększa oporność białek na proteolizę.

Funkcja proteaz komórkowych, niezależnie od tego, czy zmiany i różnice APR stwierdzone w niniejszej pracy powstają pierwotnie czy wtórnie, pozwala na przypuszczenie, że zaburzenia manifestujące się brakiem korelacji między aktywnością proteaz czynnych w pH 3,5 i pH 7,4 i spadek APR może stanowić w tkance ze zmianami arteriosklerotycznymi czynnik stymulujący zaburzenie regulatorów jej metabolizmu.

Pełniejsze zrozumienie mechanizmu zmian metabolizmu w ścianie aorty umożliwić mogą badania porównawcze procesów ana- i katabolicznych w stanach fizjologicznych i patologicznych wywoływanych wpływem różnych czynników.

PIŚMIENICTWO

1. Bałachowski I. D., Bałachowski I. S.: Metody chemicznej analizy krwi. Moskwa 1953.
2. Homolka J.: Biochemia kliniczna. PZWL, Warszawa 1971.
3. Kądziołka A., Rubaj B., Nowak J.: Spostrzeżenia nad występowaniem samoistnej arteriosklerozy u świń. Med. Wet., 24, 479, 1968.
4. Kądziołka A., Mierzejewski T., Ruciński T., Nowak J.: Metabolizm błony wewnętrznej aorty świń. Cz. I. Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania związków tłuszczowych w ścianie aorty. Pol. Arch. Wet. (w druku).
5. Mariak T., Worowski K.: Wewnątrzkomórkowe proteazy tkanek zwierzęcych. Post. Bioch., 19, 279, 1973.
6. Maier N.: Metabolism of Arterial Tissue and its Relation to Atherosclerosis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 149, 655, 1968.
7. Mejbbaum-Katzenellenbogen W., Mochacka I.: Kolorymetryczne oznaczanie białek odczynnikami Folina i Ciocalteu. Metody Lowry'ego. Kurs praktyczny z biochemii. PWN, Warszawa 1969.
8. Mierzejewski T.: Badania nad „alergenowo-specyficznym czynnikiem enzymatycznym”. II. Próby wydzielenia z moczu królików „alergenowo-specyficznego czynnika enzymatycznego”. Pol. Arch. Wet., 10, 627, 1967.
9. Mierzejewski T., Truchliński J.: Wpływ diety miazdżycotwórczej na poziom aktywności aminotransferaz: asparaginianowej 2. 6. 1. 1. (AspAT) i alaninowej 2.6. 1. 2. (AIAT) w osoczu kogutów rasy „zielononóżka”. Med. Wet., 10, 613, 1973.
10. Mierzejewski T., Truchliński J.: Aktywność aminotransferaz w osoczu kogutów żywionych karmą miazdżycotwórczą z dodatkiem kumaryny. Med. Wet., 30, 113, 1974.
11. Mierzejewski T.: Aktywność lipolityczna osocza w doświadczalnej arteriosklerozie kogutów. Med. Wet. (w druku), 1974.
12. Mierzejewski T.: Wpływ kumaryny na aktywność lipolityczną w hiperlipemicznym osoczu kogutów. Pol. Arch. Wet. (w druku), 1974.
13. Mierzejewski T., Kądziołka A., Słowikowska B.: Metabolizm błony wewnętrznej aorty świni. Cz. II. Aktywność lipolityczna w wyciągach homogenatów intymy i medii tętnicy głównej. (w druku) 1974.
14. Patelski J.: Esteraza cholesterolowa tętnicy głównej. PZWL, Warszawa 1964.
15. Patelski J., Bowyer D. E., Howard A. N., Gresham G. A.: Changes in Phospholipase A, Lipase and Cholesterol Esterase Activity in the Aorta in Experimental Atherosclerosis in the Rabbit and Rat. J. Atheroscler. Res., 8, 221, 1968.
16. Patelski J., Bowyer D. E., Howard A. N. i in.: Modification of Enzyme Activities in Experimental Atherosclerosis in the Rabbit. Atherosclerosis, 12, 41, 1970.
17. Rubaj B., Kądziołka A., Nowak J.: Histotopograficzne badania przy samoistnej arteriosklerozie świń. Annales UMCS, sectio DD, vol. XXIV, 6, Lublin 1969.
18. Smith E. B.: The Influence of Age Atherosclerosis on the Chemistry of Aortic Intima. J. Atheroscler. Res. 5, 224, 1965.
19. Szulc B.: Statystyka dla ekonomistów. PWE, Warszawa 1967.
20. Zemplenyi T.: Enzymes of the Arterial Wall. J. Atheroscler. Res., 2, 2, 1962.
21. Zieliński R.: Tablice statystyczne. PWN, Warszawa 1972.

РЕЗЮМЕ

После убоя свиней взяли грудную и брюшную аорты, которые положили в лед, потом прополоскали холодной водой (около $+7^{\circ}\text{C}$), разрезали, осушили на фильтровальной бумаге, отделили интимальную оболочку с частью медиальной и заморозили. Замороженные оболочки вложили в ступки, находящиеся во льду, раздробливали скальпелем и утирали вместе со стеклянной пылью на мезгу, добавляя порциями холодный (0°C) 30% раствор глицерина в воде (в пропорциях 5 мл глицерина на 1 г ткани).

После центрифугирования в гомогенизатах 14 оболочек аорт с макроскопически заметными артериосклеротическими изменениями (А) и 14 оболочек артериосклеротически неизмененные (Вз), определено активность клеточных протеаз (APR) при pH 3,5 а также pH 7,4.

В APR с pH 3,5 и APR с pH 7,4 наступили статистически значимые ($\alpha=0,005$) разницы между группой А и Вz. В группе Вz установлено высшее значение APR pH 3,5 и APR pH 7,4 как в группе А. Между APR pH 3,5 и APR pH 7,4 не было корреляции в группе А, зато в то время в группе Вz APR при этих же pH выступала корреляция.

Учитывая физиологическую функцию клеточных протеаз предполагается, что отмеченные в группе А изменения APR могут играть роль фактора, стимулирующего расстройства регулятора метаболизма в ткани с артериосклеротическими изменениями.

SUMMARY

Shortly after slaughter the thoracic and abdominal aortas of pigs were isolated placed in ice, washed in cool water (ca. $+7^{\circ}\text{C}$), dissected and dried with filter paper. Next, the intima and a part of the media were isolated and frozen. The frozen membranes were placed in mortars immersed in ice and comminuted, next reduced to a pulp and mixed with glassy dust; to this was added in portions 15 per cent cold (0°C) glycerol solution in buffer tris in the relation: 5 ml of 15 per cent glycerol per 1 g of tissue.

After centrifugating in homogenizates 14 membranes of aortas with arteriosclerotic changes observable macroscopically (A), as well as 14 membranes without such changes (Bz), the activity of cellular proteases (APR) at pH 3.5 and pH 7.4 was determined.

In APR with pH 3.5 and APR with pH 7.4 there occurred statistically significant differences ($\alpha=0.005$) between the groups A and Bz. It was ascertained that in the group Bz the APR pH 3.5 values and APR pH 7.4 values were higher than in the group A. Between APR pH 3.5 and APR pH 7.4 there was no correlation in group A, but at the same time in group Bz APR showed a significant correlation in these pH-s.

On account of the physiological function of cellular proteases it is assumed that APR changes in group A may constitute an agent stimulating perturbation of metabolism regulators in the tissue with arteriosclerotic changes.