

УДК 617.24-02:616.36

DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i3.8390

О. Є. Любович, І. М. Кліщ, А. С. Вольська, Х. І. Курило

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

СТАН СИСТЕМИ ПРОТЕЇНАЗИ/ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНАЗ У ЩУРІВ У ДИНАМІЦІ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ НА ТЛІ ГІПОТИРЕОЗУ

Вступ. У патогенезі багатьох патологічних станів важливе місце посідають порушення протеїназо-інгібіторної системи. При відсутності належного контролю за протеолізом розвиваються патологічні стани, що супроводжуються виникненням деструктивних, запальних та імунних реакцій. Ряд дослідників встановив захисну дію йодовмісних тиреоїдних гормонів при стресі, які реалізуються в результаті їх взаємодії з клітинним геномом, що призводить до стимуляції локальних стрес-лімітуючих систем.

Мета дослідження – встановити особливості функціонування системи протеїнази/інгібітори протеїназ за умов іммобілізаційного стресу на тлі зниження рівня йодовмісних гормонів щитоподібної залози.

Методи дослідження. Гіпотиреоз моделювали, щоденно вводячи тваринам *per os* тиреостатик мерказоліл ("Здоров'я", Україна) у дозі 25 мг/кг протягом 21-ї доби. Гострий іммобілізаційний стрес моделювали шляхом прив'язування піддослідних щурів у положенні на спині за 4 кінцівки без обмеження рухомості голови тривалістю 3 год. Для дослідження концентрації йодовмісних гормонів щитоподібної залози, активності протеїназої системи і вмісту інгібіторів протеолізу використано спектрофотометричні та імуноферментні методи.

Результати й обговорення. Досліджено вплив іммобілізаційного стресу в щурів з попередньо змодельованим гіпотиреозом на показники протеїназо-інгібіторної системи крові. На стадії тривоги розвитку стрес-реакції в еутиреоїдних тварин встановлено підвищення протеолітичної активності крові на тлі збільшення вмісту α_1 -інгібітора протеаз та α_2 -макроглобуліну, що вказує на посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. На стадії резистентності відбувалася стабілізація протеолітичної активності крові. Однак при тривалому стресі (стадія виснаження) вона знову достовірно зростала на тлі зниження активності інгібіторів протеаз, що свідчить про виснаження захисного інгібіторного резерву. У тварин з гіпотиреозом на всіх стадіях розвитку стрес-реакції мало місце достовірне підвищення протеолітичної активності крові, причому показники інгібіторів протеаз достовірно зменшувалися. Це призводило до різкого зростання індексу протеолізу, що відбувалося на тлі збільшення проникності лізосомальних мембран.

Висновок. На тлі гіпотиреозу спостерігають інтенсивніше, ніж у еутиреоїдних тварин, зростання протеолітичної активності крові на фоні пригнічення антипротеазної активності та збільшення проникності лізосомальних мембран.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: стрес; гіпотиреоз; протеїназо-інгібіторна система; лізосомальні мембрани.

ВСТУП. У патогенезі багатьох патологічних станів важливе місце посідають порушення протеїназо-інгібіторної системи [1–3]. Процеси лімітованого (обмеженого) протеолізу відіграють важливу роль в утворенні з неактивних попередників активних форм ферментів, гормонів, структурних білків, білків плазми крові, утворенні та інактивації біоактивних пептидів (кініни, нейропептиди), що беруть участь у регуляції судинного тону, процесів мікроциркуляції, функції мозку тощо [1].

При відсутності належного контролю за протеолізом розвиваються патологічні стани, що супроводжуються виникненням деструктивних,

запальних та імунних реакцій. Різноманітний спектр фізіологічної дії протеїназ, їх висока активність стосовно білкових субстратів зумовлюють складність механізмів регуляції цих процесів в організмі [3, 4]. Біологічна активність протеолітичних ферментів визначається концентрацією ферменту й субстрату, рН, іонною силою і температурою. Проте вміст у крові та тканинах специфічних білків (α_1 -інгібітора протеїназ (α_1 -ІП), α_2 -макроглобуліну (α_2 -МГ), антитромбіну III, α_2 -антиплазміну, α_1 -антихімотрипсину тощо), які утворюють комплекси з протеїназами, є однією з найбільш важливих ланок контролю за протеолізом [1, 5, 6].

За фізіологічних умов активність протеолітичних ферментів урівноважена з рівнем інгібі-

© О. Є. Любович, І. М. Кліщ, А. С. Вольська, Х. І. Курило, 2018.

торів протеїназ. При критичних станах порушується динамічна рівновага між протеазами та їх інгібіторами. Збільшення кількості та активності ферментів протеолізу тканинного походження призводить до "протеазного вибуху", у зв'язку з чим гіперактивуються згортальна, фібринолітична, калікреїн-кінінова, ренін-ангіотензин-альдостеронова системи і комплемент. Викликані зміни зумовлюють розвиток деструктивних і запальних змін у всьому організмі [1, 3, 7].

За дії різних патогенних чинників спостерігають значне підвищення активності протеолітичних ферментів, і вони з фактора регуляції перетворюються на чинник пошкодження [1, 8]. Однією з причин, які зумовлюють цю трансформацію, є зниження активності ендогенних інгібіторів протеїназ і збільшення проникності лізосомальних мембран [9, 10].

Найбільш розповсюдженими серед протеолітичних ферментів є серинові протеїнази. Їх регуляторна функція здійснюється за реакціями двох типів: повне розщеплення білків до амінокислот і лімітований протеоліз. Найбільш цікавим для дослідження серед різних інгібіторів плазми крові є α_1 -інгібітор протеїназ, оскільки близько 90 % трипсинінгібіторної активності плазми припадає на його частку.

Іншим важливим інгібітором протеїназ є α_2 -макроглобулін, який утворює комплекси з протеїназами всіх класів: сериновими, тіоловими, металозалежними та кислими. Він здатен пригнічувати активність більшості протеїназ широкого спектра дії. Беручи до уваги важливу роль α_2 -МГ у регуляції і модифікації активності протеолітичних систем крові й тканин, дослідження рівнів цього білка стали широко використовувати в клініці [5].

Ряд дослідників встановив захисну дію йодовмісних тиреоїдних гормонів при стресі, які реалізуються в результаті їх взаємодії з клітинним геномом, що призводить до стимуляції локальних стрес-лімітуючих систем – білків теплового шоку й антиоксидантних ферментів [11–14]. Однак роль йодовмісних гормонів щитоподібної залози в змінах системи протеолізу, викликаних стресом, досліджено недостатньо.

Зважаючи на це, метою дослідження було встановити особливості функціонування системи протеїнази/інгібітори протеїназ за умов іммобілізаційного стресу на тлі зниження рівня йодовмісних гормонів щитоподібної залози.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для вивчення особливостей перебігу стрес-реакції на тлі гіпотиреозу (ГТ) використовували білих щурів-самців лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію при вільному

доступі до води відповідно до вимог Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [15, 16]. У кожному експериментальну групу методом випадкової вибірки включено по 10 тварин масою (210 ± 20) г. Усього в дослідженні використано 84 тварини, однак унаслідок загибелі впродовж експерименту на момент евтаназії було 80 щурів.

Гіпотиреоз моделювали, щоденно вводячи тваринам пер ос за допомогою зонда фармакопейний тиреостатик мерказоліл ("Здоров'я", Україна) у дозі 25 мг/кг протягом 21-ї доби [17]. Повноту досягнення гіпотиреозу контролювали шляхом визначення концентрації трийодтироніну і тироксину в сироватці крові, а також за динамікою маси тварин та їх рухової активності.

Вплив гіпотиреозу на перебіг іммобілізаційного стресу вивчали на моделі іммобілізаційного стресу [11]. Гострий іммобілізаційний стрес (ГІС) моделювали шляхом прив'язування піддослідних щурів у положенні на спині за 4 кінцівки без обмеження рухомості голови тривалістю 3 год. Дослідження проводили через 2 (стадія тривоги) та 48 год (стадія резистентності) після завершення дії стресорного фактора. Хронічний іммобілізаційний стрес (ХІС), що є аналогом стадії виснаження, моделювали тим же методом, який повторювали протягом 5 діб. Дослідження проводили через 2 год після останнього моделювання [11].

Експериментальних тварин поділили на 8 груп:

- інтактні тварини, яким перорально вводили дистильовану воду протягом 21-ї доби;
- тварини, яким моделювали гіпотиреоз шляхом перорального введення мерказолілу в дозі 25 мг/кг протягом 21-ї доби;
- тварини, яким моделювали гострий іммобілізаційний стрес і проводили евтаназію на стадії тривоги (2 год);
- тварини, яким моделювали гострий іммобілізаційний стрес і проводили евтаназію на стадії резистентності (48 год);
- тварини, яким моделювали гострий іммобілізаційний стрес на тлі попередньо змодельованого гіпотиреозу (стадія тривоги);
- тварини, яким моделювали гострий іммобілізаційний стрес на тлі попередньо змодельованого гіпотиреозу (стадія резистентності);
- тварини, яким моделювали хронічний іммобілізаційний стрес;
- тварини, яким моделювали хронічний іммобілізаційний стрес на тлі попередньо змодельованого гіпотиреозу.

Для дослідження використовували сироватку крові та гомогенат печінки. Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом через 2 і 48 год від моменту завершення одноразової іммобілізації та через 2 год від моменту завершення моделювання хронічного іммобілізаційного стресу.

Вміст загального тироксину (T_4) і загального трийодтироніну (T_3) у сироватці крові визначали імунофлуоресцентним методом із використанням стандартних тест-наборів "Immulite 1000". Концентрацію гормонів виражали в пмоль/л.

Загальну протеолітичну активність плазми крові визначали за лізисом азоальбуміну, азоказеїну й азоколу, використовуючи набір реактивів "Simko Ltd" (Україна), методом [1], принцип якого полягає в тому, що при інкубації білкових азосполук у присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться у тканинах, відбувається лізис азоальбуміну (розпад низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (розпад високомолекулярних протеїнів) та азоколагену (колагеноліз), інтенсивність якого оцінювали за ступенем забарвлення інкубаційного середовища на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 440 нм. Протеолітичну активність виражали в одиницях екстинкції на 1 мл плазми за 1 год.

Вміст α_2 -МГ у сироватці крові визначали методом, принцип якого полягає в тому, що він утворює з трипсином активний комплекс, який є нечутливим до дії інгібітора з бобів сої. Для виконання методики використовували трипсин ("Spofa", Чехія). Концентрацію α_2 -МГ визначали за калібрувальним графіком, в якому по осі абсцис відкладали кількість трипсину, а по осі ординат – оптичну щільність проб, в яких відбувся гідроліз N-бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроаніліду (БАПНА) відповідною концентрацією трипсину. Концентрацію α_2 -МГ у сироватці крові виражали в г/л [5].

Вміст α_1 -ІП у сироватці крові визначали методом, що базується на його здатності пригнічувати гідроліз трипсином БАПНА. Водночас трипсин у комплексі з α_2 -МГ здатний розщеплювати БАПНА. Вміст α_1 -ІП визначали за різницею між відомою кількістю трипсину і кількістю ферменту, що залишився після його взаємодії з інгібіторами плазми. Вміст цього інгібітора визначали за калібрувальним графіком, в якому по осі абсцис відкладали кількість трипсину (1–10 мкг), а по осі ординат – оптичну щільність проб, в яких відбувся гідроліз БАПНА відповідною концентрацією трипсину. Вміст α_1 -ІП у сироватці крові виражали в мкмоль/л [8].

Розраховували індекс протеолізу, що відображає напруженість або "керованість" протеолітичних процесів, як відношення загальної про-

теолітичної активності до сумарної інгібіторної ємності (сума активності α_1 -ІП і α_2 -МГ) [7].

Для приготування гомогенату тканину печінки розтирали за допомогою гомогенізатора при 4 °С і суспендували в 9 об'ємах 0,25 М розчину цукрози з 0,001 М Na_2EDTA (рН 7,4). Сполучно-тканинні елементи, які залишились у середовищі, видаляли шляхом центрифугування (1000 об./хв протягом 3 хв) при охолодженні. Надосадову частину гомогенату печінки використовували для досліджень. Загальну активність катепсину D у гомогенаті тканини печінки визначали за методом Дингла в модифікації [10]. Активність ферменту виражали в мкМ тирозину/(мг білка·год).

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Excel і STATISTICA з використанням параметричних та непараметричних методів оцінки отриманих даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за t-критерієм Стьюдента, в інших випадках – за допомогою U-критерію Манна-Уїтні (достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З метою оцінки функціонального стану щитоподібної залози у тварин, яким моделювали гіпотиреоз, визначали концентрацію тиреоїдних гормонів у крові. Концентрація T_3 у здорових щурів складала $(5,96 \pm 0,22)$ пмоль/л, а у тварин, яким вводили мерказоліл, показник був знижений у 2,7 раза і становив $(2,19 \pm 0,21)$ пмоль/л. Концентрація T_4 в інтактних щурів складала $(10,16 \pm 0,69)$ пмоль/л, а після введення мерказолілу зменшилась у 2,4 раза від показника інтактних тварин і становила $(4,27 \pm 0,28)$ пмоль/л. Ми спостерігали також суб'єктивні ознаки гіпотиреозу: зменшення рухомості, інтенсивніше, ніж в інтактних тварин, зростання маси тіла, зміни шерсті. Це вказує на розвиток у тварин явищ гіпотиреозу внаслідок уведення мерказолілу в дозі 25 мг/кг протягом 21-ї доби.

Показники протеолітичної активності сироватки крові в щурів, яким протягом 21-ї доби вводили мерказоліл, були меншими, ніж у тварин без змодельованої патології, однак лише стосовно лізису азоальбуміну це зниження було достовірним. При моделюванні гострого іммобілізаційного стресу динаміка протеолітичної активності змінювалась залежно від стадії патологічного процесу. Так, лізис азоальбуміну на стадії тривоги був достовірно вищим від показника щурів без змодельованої патології і складав

145,5 % від нього. Аналогічні зміни відмічено і стосовно лізису азоказеїну та азоколу. Зокрема, показник лізису азоказеїну на цій стадії становив 132,6 %, а азоколу – 143,9 % від рівня тварин, яким патологічних станів не моделювали, в обох випадках різниця між показниками була достовірною. На стадії резистентності показник лізису азоальбуміну нормалізувався і лише на 10,3 % перевищував рівень щурів без змодельованої патології. Зміни показників лізису азоказеїну та азоколу мали аналогічну спрямованість і через 48 год після моделювання ГС склали, відповідно, 111,1 та 106,6 % від показників тварин 1-ї групи, достовірно не відрізняючись від них. Моделювання ХІС спричинило значно відчутніші зміни показників протеолітичної активності порівняно з моделюванням ГС. Зокрема, лізис азоальбуміну в щурів цієї групи перевищував показник тварин без змодельованої патології в 1,7 раза, лізис азоказеїну – в 1,4 раза, азоколу – в 1,6 раза. Зміни були достовірними відносно тварин 1-ї групи.

Отже, протеолітична активність сироватки крові евтиреоїдних тварин з іммобілізаційним стресом змінюється залежно від стадії стресу: зростає на стадії тривоги, нормалізується на стадії резистентності з подальшим прогресивним підвищенням на стадії виснаження (табл. 1).

Моделювання ГС тваринам, яким попередньо змодельювали гіпотиреоз, призводило до більш виражених змін протеолітичної активності сироватки крові. Лізис азоальбуміну на стадії тривоги у тварин цієї групи перевищував рівень щурів без змодельованої патології в 1,6 раза і був на 17,4 % більшим, ніж на відповідній стадії в евтиреоїдних тварин. Лізис азоказеїну був більшим від рівня евтиреоїдних тварин на 11,1 %, перевищуючи показник щурів 1-ї групи в 1,4 раза. Аналогічну спрямованість мав також

лізис азоколу – показник був на 24,4 % більшим, ніж в евтиреоїдних тварин, перевищуючи рівень щурів без змодельованої патології в 1,7 раза.

На стадії резистентності, на відміну від евтиреоїдних тварин, не спостерігали нормалізації протеолітичної активності. Зокрема, лізис азоальбуміну був більшим від рівня щурів без змодельованої патології в 1,5 раза, перевищуючи аналогічний показник евтиреоїдних тварин на 41,5 %. Лізис азоказеїну був майже аналогічним до показника азоальбуміну, а лізис азоколу був ще більш вираженим у тварин цієї групи, перевищуючи в 1,8 раза рівень щурів без змодельованої патології і на 73,8 % – відповідний показник евтиреоїдних тварин на цій стадії стресу.

Найбільш виражені зміни протеолітичної активності ми спостерігали у тварин з гіпотиреозом на стадії виснаження. Лізис азоальбуміну у тварин цієї групи перевищував рівень щурів без змодельованої патології в 1,8 раза і був на 19,8 % більшим, ніж в евтиреоїдних тварин відповідної групи. Лізис азоказеїну був дещо меншим – перевищення стосовно тварин 1-ї групи становило 1,6 раза, що на 16,1 % більше, ніж у щурів з нормальним вмістом тиреоїдних гормонів. Водночас лізис азоколу був найвищим – 194 % від показника щурів 1-ї групи і на 31,7 % більше, ніж в евтиреоїдних тварин із ХІС.

Отже, за умов попередньо змодельованого гіпотиреозу показники протеолітичної активності сироватки крові достовірно перевищують аналогічні показники евтиреоїдних тварин, причому їх відновлення на стадії резистентності, яке спостерігають у щурів з нормальним рівнем йодовмісних гормонів щитоподібної залози, не відбувається за умов гіпотиреозу (табл. 1).

Вміст білкових інгібіторів плазми крові також зазнавав виражених змін (табл. 2). Встановлено достовірне підвищення інгібіторного потенціалу

Таблиця 1 – Динаміка показників протеолітичної активності сироватки крові щурів з іммобілізаційним стресом на тлі гіпотиреозу (M±m)

Група тварин		Показник		
		лізис азоальбуміну, мл ⁻¹ ·год ⁻¹	лізис азоказеїну, мл ⁻¹ ·год ⁻¹	лізис азоколу, мл ⁻¹ ·год ⁻¹
Інтактні, n=12		2,53±0,12	2,24±0,13	0,82±0,10
Гіпотиреоз, n=12		2,11±0,07*	1,86±0,08	0,75±0,09
Іммобілізаційний стрес	ГС (стадія тривоги), n=10	3,68 ±0,09*	2,97±0,11*	1,18±0,07*
	ГС (стадія резистентності), n=10	2,79±0,11	2,49±0,09	0,87±0,09
	ХІС (стадія виснаження), n=9	4,17±0,14*	3,18±0,12*	1,33±0,12*
ГТ+ іммобілізаційний стрес	ГС (стадія тривоги), n=10	4,12±0,12**	3,22±0,11**	1,38±0,11**
	ГС (стадія резистентності), n=10	3,84±0,09**	3,44±0,13**	1,47±0,13**
	ХІС (стадія виснаження), n=7	4,67±1,13**	3,54±0,12**	1,59±0,12**

Примітки. Тут і в таблиці 2:

1. * – зміни показників евтиреоїдних і гіпотиреоїдних тварин з гострим та хронічним стресом достовірні відносно показників інтактних тварин (p<0,05).

2. # – зміни показників гіпотиреоїдних тварин з гострим і хронічним стресом достовірні відносно показників евтиреоїдних тварин на відповідні доби дослідження (p<0,05).

Таблиця 2 – Динаміка показників інгібіторів протеаз сироватки крові та катепсину D печінки щурів з іммобілізаційним стресом на тлі гіпотиреозу (M±m)

Група тварин		Показник			
		α_1 -ІП, мкмоль/л	α_2 -МГ, г/л	індекс протеолізу	катепсин D, мкМ тирозину/ (мг білка·год)
Інтактні, n=12		42,45±2,46	2,52±0,08	0,124±0,006	3,871±0,081
Гіпотиреоз, n=12		38,27±1,62	2,35±0,09	0,116±0,007	3,657±0,073
Іммобілізаційний стрес	ГІС (стадія тривоги), n=10	57,64±1,37*	4,22±0,14*	0,126±0,006	4,482±0,114*
	ГІС (стадія резистентності), n=10	49,33±2,11*	3,08±0,07*	0,117±0,008	3,749±0,101
	ХІС (стадія виснаження), n=9	31,22±1,33*	1,37±0,08*	0,266±0,014*	4,816±0,112*
ГТ+іммобілізаційний стрес	ГІС (стадія тривоги), n=10	26,47±1,37**	1,42±0,07**	0,230±0,011**	4,711±0,127**
	ГІС (стадія резистентності), n=10	22,67±1,16**	1,35±0,08**	0,364±0,018**	4,545±0,103**
	ХІС (стадія виснаження), n=7	18,25±1,09**	1,14±0,07**	0,505±0,021**	5,432±0,131**

крові евтиреоїдних тварин з ГІС, в основному за рахунок збільшення концентрації α_2 -МГ, яка зросла в 1,7 раза, на стадії тривоги. Щодо α_1 -ІП, то його концентрація теж зросла, однак дещо менше – в 1,4 раза порівняно зі щурами без змодельованої патології. Виражене збільшення вмісту α_2 -МГ може бути зумовлене його підвищенням продукуванням паралельно з гіперпродукуванням інших гострофазових білків у відповідь на дію стресорного чинника. Крім того, зростання активності основних білкових інгібіторів можна розцінювати як неспецифічну захисну реакцію організму на посилений протеоліз та запуск фізіологічних процесів адаптації у відповідь на підвищення протеолітичної активності крові. Таке збільшення інгібіторного потенціалу, поряд із зростанням протеолітичної активності, суттєво не відобразилося на значенні індексу протеолізу в цей період патологічного процесу. На стадії тривоги в щурів з нормальною функцією щитоподібної залози мало місце відновлення інгібіторного потенціалу порівняно з попереднім терміном дослідження. Концентрація α_1 -ІП перевищувала рівень тварин 1-ї групи на 16,2 %, а α_2 -МГ – на 22,2 %. Однак, зважаючи на зменшення в цей період протеолітичної активності крові, індекс протеолізу навіть дещо знизився і становив 94,3 % від показника щурів 1-ї групи. За умов моделювання ХІС вміст білкових інгібіторів у сироватці крові суттєво зменшився. Концентрація α_1 -ІП складала 73,5 % стосовно тварин 1-ї групи, а α_2 -МГ – 54,4 %, що вказувало на виснаження антипротеазних резервів крові. Це призводило до активації процесів протеолізу, про що свідчило достовірне зростання індексу протеолізу в 2,1 раза.

Моделювання іммобілізаційного стресу на тлі гіпотиреозу вказує на суттєвий зсув співвідношення протеази/інгібітори протеаз у бік переважання процесів протеолізу. Вже на стадії тривоги вміст обох ключових інгібіторів протеолізу достовірно знижувався стосовно як щурів без змодельованої патології, так і евтиреоїдних

тварин зі стресом. Зокрема, концентрація α_1 -ІП становила 62,4 %, а α_2 -МГ – 56,3 % від рівня щурів 1-ї групи, достовірно відрізняючись від аналогічних показників евтиреоїдних тварин з ГІС – у 2,2 та 2,9 раза відповідно. Це призвело до суттєвого зростання індексу протеолізу – в 1,9 раза порівняно зі щурами 1-ї групи та в 1,8 раза порівняно з евтиреоїдними тваринами.

На стадії резистентності, на відміну від тварин з нормальним рівнем йодовмісних гормонів щитоподібної залози, ми відмітили подальше зниження інгібіторної активності крові. Концентрація α_1 -ІП становила 53,4 %, а α_2 -МГ – 53,6 % від рівня щурів без змодельованої патології, водночас достовірно відрізняючись від аналогічних показників евтиреоїдних тварин – у 2,2 і 2,3 раза відповідно. Індекс протеолізу зростав ще більше і перевищував показник щурів 1-ї групи у 2,9 раза, а евтиреоїдних тварин – у 3,1 раза.

На стадії виснаження, за умов хронічного іммобілізаційного стресу, інгібіторний потенціал крові ще більше знижувався. Зокрема, концентрація α_1 -ІП становила 43,0 %, а α_2 -МГ – 45,2 % від рівня щурів 1-ї групи. Незважаючи на те, що в евтиреоїдних тварин за цих умов дані показники також знижувалися, зменшення у тварин з гіпотиреозом було значно суттєвішим: стосовно α_1 -ІП – в 1,7 раза, а щодо α_2 -МГ – в 1,2 раза. Це призвело до достовірного, порівняно зі щурами без змодельованої патології та евтиреоїдними тваринами з ХІС, зростання індексу протеолізу – в 4,1 і 1,9 раза відповідно (табл. 2).

Дослідження загальної активності маркерного ферменту лізосомального матриксу – катепсину D показало, що при гіпотиреозі вона зменшується. Моделювання ГІС призвело до достовірного зростання загальної активності катепсину D на стадії тривоги на 15,8 % з подальшим її зниженням на стадії резистентності до 96,8 % відносно щурів без змодельованої патології, що вказувало на стабілізацію лізосомальних мембран у цей період патологічного

процесу. На стадії виснаження, при моделюванні ХІС, активність катепсину D суттєво підвищувалась порівняно з попереднім терміном спостереження і становила 124,4 % від рівня тварин 1-ї групи. У щурів з гіпотиреозом ми спостерігали достовірне її зростання на всіх стадіях патологічного процесу. Зокрема, на стадії тривоги вона становила 121,7 % від рівня щурів без змодельованої патології і була на 6,1 % вищою від показника евтиреоїдних тварин на цій стадії патологічного процесу. На стадії резистентності

показник складав 117,4 % від рівня щурів 1-ї групи, що на 20,6 % більше, ніж у евтиреоїдних тварин, на стадії виснаження – 140,3 %, що також вище від показника евтиреоїдних тварин на 15,9 %.

ВИСНОВОК. На тлі гіпотиреозу спостерігають інтенсивніше, ніж у евтиреоїдних тварин, зростання протеолітичної активності крові на фоні пригнічення антипротеазної активності та збільшення проникності лізосомальних мембран.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веремеенко К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – К. : Здоров'я, 1988. – 200 с.
2. Кресюн В. Й. Особливості зрушень стану протеїназо-інгібіторної системи за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту і шляхи його корекції / В. Й. Кресюн, Н. Г. Семенців, М. С. Рєгєда // Одес. мед. журн. – 2009. – № 3 (113). – С. 35–37.
3. Криницька І. Я. Стан протеїназо-інгібіторної системи крові та бронхоальвеолярного змиву у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом / І. Я. Криницька // Заг. патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – 7, № 4. – С. 92–97.
4. Швець В. І. Зміни тканинного протеолізу при інтоксикації білих щурів малими дозами важких металів / В. І. Швець, В. Л. Кісілюк, І. Д. Шкробанець // Клініч. та експерим. патологія. – 2009. – 8, № 4 (30). – С. 87–89.
5. Универсальный регулятор – α_2 -макроглобулин / Н. А. Зорин, В. Н. Зорина, Р. М. Зорина, В. Г. Левченко // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 11. – С. 18–21.
6. Sousa G. A. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors / G. A. Sousa, L. M. F. Godoy, M. Mann // Genome Biol. – 2006. – 7, No. 8. – P. 72.
7. Дедуль М. И. Система протеолиза в сыворотке крови и перитонеальной жидкости при хирургическом лечении больных эндометриозом / М. И. Дедуль, Л. Е. Радецкая, Л. Н. Кирпиченко // Новости хирургии. – 2006. – 14, № 3. – С. 74–80.
8. Карягина И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Карягина, Р. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лаб. дело. – 1990. – № 2. – С. 10–13.
9. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов / под ред. В. Ю. Сереброва, Г. А. Сухановой. – Томск : СГМУ, 2008. – 180 с.
10. Подунай Ю. А. Возрастная динамика активности катепсина и содержания средномолекулярных пептидов в мышцах морского ерша / Ю. А. Подунай, И. Н. Залевская, И. И. Руднева // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Серия "Биология, химия". – 2009. – 22 (61), № 4. – С. 128–134.
11. Бондаренко С. Н. Влияние различных методик стрессирования и адаптации на поведенческие и соматические показатели у крыс / С. Н. Бондаренко, Н. А. Бондаренко, Е. Б. Манухина // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – 128, № 8. – С. 157–160.
12. Данилкина О. П. Физиология стресса животных : метод указания / О. П. Данилкина ; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2016. – 32 с.
13. Паєнок О. С. Процеси пероксидного окиснення ліпідів і рівень ендогенної інтоксикації у вагітних із тиреопатіями / О. С. Паєнок, М. О. Костів // Експерим. та клініч. фізіологія та біохімія. – 2012. – № 1. – С. 97–101.
14. Роль локальных стресс-лимитирующих систем миокарда в протекторном кардиальном эффекте малых доз тиреоидных гормонов при иммобилизационном стрессе у крыс / И. Ю. Мальшев, Л. Ю. Голубева, А. П. Божко, И. В. Городецкая // Росс. физиол. журн. – 2000. – 86, № 1. – С. 62–67.
15. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін. – К. : Авіцена, 2002. – 155 с.
16. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – No. 123. – 52 p.
17. Ром-Бугославська О. С. Доклінічне вивчення тиреостатичних та тиреоїдстимулюючих засобів / О. С. Ром-Бугославська, Т. С. Божко, І. В. Комарова // Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. – К., 2001. – С. 409–420.

REFERENCES

1. Veremeyenko, K.N., Goloborodko, O.P., & Kizim, A.I. (1988). *Proteoliz v norme i pri patologii* [Proteolysis in health and disease]. Kyiv: Zdorovia [in Russian].
2. Kresiun, V.Y., Sementsiv, N.H., & Reheda, M.S. (2009). Osoblyvosti zrushen stanu proteinazno-inhibitornoi systemy za umov rozvytku eksperymentalnoho alerhichnoho alveolitu i shliakhy yoho korektsii [Features of shifts of the proteinase-inhibitory system under the conditions of development of experimental allergic alveolitis and ways of its correction]. *Odeskyi medychnyi zhurnal – Odesa Medical Journal*, 3 (113), 35-37 [in Ukrainian].
3. Krynytska, I.Ya. (2012). Stan proteinazo-inhibitornoi systemy krovi ta bronkhoalveoliarnoho zmyvu u shchuriv z modelovanyim hepatopulmonalnym syndromom [The state of the proteinase-inhibitor system of blood and bronchoalveolar wash in rats with simulated hepatopulmonary syndrome]. *Zahalna patolohiia ta patolohichna fiziolohiia – General Pathology and Pathological Physiology*, 7, 4, 92-97 [in Ukrainian].
4. Shvets, V.I., Kisiliuk, V.L., & Shkrobanets, I.D. (2009). Zminy tkanynnoho proteolizu pry intoksykatsii bilykh shchuriv malymy dozamy vazhkykh metaliv [Changes in tissue proteolysis due to intoxication of white rats by small doses of heavy metals]. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiia – Clinical and Experimental Pathology*, 8, 4 (30), 87-89 [in Ukrainian].
5. Zorin, N.A., Zorina, V.N., Zorina, R.M. & Levchenko, V.G. (2004). Universalnyy regulyator – α 2-makroglobulin [Universal regulator - α 2-macroglobulin]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika – Clinical Laboratory Diagnostics*, 11, 18-21 [in Russian].
6. Sousa, G.A., Godoy, L.M.F., & Mann, M. (2006). Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol.*, 7, 8, 72.
7. Dedul, M.I., Radetskaya, L.Ye. & Kirpichenok, L.N. (2006). Sistema proteoliza v syvorotke krovi i peritonealnoy zhidkosti pri khirurgicheskom lechenii bolnykh endometriozom [The system of proteolysis in the serum and peritoneal fluid in the surgical treatment of patients with endometriosis]. *Novosti khirurgii – Surgery News*, 14, 3, 74-80 [in Russian].
8. Karyagina, I.Yu., Zaremskiy, R.A. & Balyabina, M.D. (1990). Ispolzovaniye metoda kompleksnogo opredeleniya aktivnosti tripsinopodobnykh proteinaz, α 1-antitripsina i α 2-makroglobulina v gastroenterologicheskoy klinike [Using the method of complex determination of activity of trypsin-like proteinases, α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin in a gastroenterological clinic]. *Laboratornoye delo – Laboratory Case*, 2, 10-13 [in Russian].
9. Serebrova, V.Yu., & Sukhanova, G.A. (Ed.). (2008). *Bioenergetika kletki. Khimiya patologicheskikh protsessov* [Bioenergy of cells. Chemistry of pathological processes]. Tomsk: SGMU [in Russian].
10. Podunay, Yu.A., Zalevskaya, I.N., & Rudneva, I.I. (2009). Vozrastnaya dinamika aktivnosti katepsinov i sodержaniya srednemolekulyarnykh peptidov v mysh-tsakh morskogo yersha [Age dynamics of cathepsin activity and the content of medium molecular peptides in the muscles of the rock fish]. *Uchenyye zapiski Tavricheskogo natsionalnogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya "Biologiya, khimiya" – Scientific notes of the V. I. Vernadsky Tauride National University Series "Biology, Chemistry"*, 22 (61), 4, 128-134 [in Russian].
11. Bondarenko, S.N., Bondarenko, N.A. & Manukhina, Ye.B. (1999). Vliyaniye razlichnykh metodik stressirovaniya i adaptatsii na povedencheskiye i somaticheskkiye pokazateli u kryis [The influence of various stress and adaptation techniques on behavioral and somatic indicators in rats]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 128, 8, 157-160 [in Russian].
12. Danilina, O.P. *Fiziologiya stressa zhivotnykh* [Physiology of stress in animals]. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk gos. agrar. un-t [in Russian].
13. Payenok, O.S., & Kostiv, M.O. (2012). Protsesy peroksydnoho okysnennia lipidiv i riven endohennoi intoksykatsii u vahitnykh iz tyreopatiiamy [Processes of peroxide oxidation of lipids and the level of endogenous intoxication in pregnant women with thyropathies]. *Eksperymentalna ta klinichna fiziolohiia ta biokhimiia – Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*, 1, 97-101 [in Ukrainian].
14. Malyshev, I.Yu. (2000). Rol lokalnykh stress-limitiruyushchikh sistem miokarda v protektnom kardialnom effekte malykh doz tireoidnykh gormonov pri immobilizatsionnom stresse u kryis [The role of local stress-limiting systems of the myocardium in the protective cardiac effect of low doses of thyroid hormones during immobilization stress in rats]. *Rosssiyskiy fiziologicheskii zhurnal – Russian Physiological Journal*, 86, 1, 62-67 [in Russian].
15. Kozhemyakin, Yu.M. (2002). *Naukovo-praktychni rekomendatsii z utrymannia laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy* [Scientific and practical recommendations for the maintenance of laboratory animals and work with them]. Kyiv [in Ukrainian].
16. (1986). European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *Council of Europe. Strasbourg*, 123, 52.
17. Rom-Buhoslavska, O.S., Bozhko, T.S., & Komarova, I.V. (2001). *Doklinichne vyvchennia tyreostatychnykh ta tyreoid-stymuliuyuchykh zasobiv. Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv: metod. rekomendatsii* [Pre-clinical study of thyreostatic and thyroid stimulating agents. Preclinical research of drugs: method. recommendations]. Kyiv [in Ukrainian].

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТЕИНАЗЫ/ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ У КРЫС В ДИНАМИКЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА ФОНЕ ГИПОТИРЕОЗА

Резюме

Вступление. В патогенезе многих патологических состояний важное место занимают нарушения протеиназо-ингибиторной системы. При отсутствии надлежащего контроля за протеолизом развиваются патологические состояния, сопровождающиеся возникновением деструктивных, воспалительных и иммунных реакций. Ряд исследователей установил защитное действие йодсодержащих тиреоидных гормонов при стрессе, которые реализуются в результате их взаимодействия с клеточным геномом, что приводит к стимуляции локальных стресс-лимитирующих систем.

Цель исследования – установить особенности функционирования системы протеиназы/ингибиторы протеиназ в условиях иммобилизационного стресса на фоне снижения уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы.

Методы исследования. Гипотиреоз моделировали, ежедневно вводя животным *per os* тиреостатик мерказолил ("Здоровье", Украина) в дозе 25 мг/кг в течение 21-х суток. Острый иммобилизационный стресс моделировали путем привязывания подопытных крыс в положении на спине за 4 конечности без ограничения подвижности головы продолжительностью 3 ч. Для исследования концентрации йодсодержащих гормонов щитовидной железы, активности протеиназной системы и содержания ингибиторов протеолиза использованы спектрофотометрические и иммуноферментные методы.

Результаты и обсуждение. Исследовано влияние иммобилизационного стресса у крыс с предварительно смоделированным гипотиреозом на показатели протеиназо-ингибиторной системы крови. На стадии тревоги развития стресс-реакции в эутиреоидных животных установлено повышение протеолитической активности крови на фоне увеличения содержания α_1 -ингибитора протеаз и α_2 -макроглобулина, что указывает на усиление антипротеолитического потенциала для сдерживания развития деструкции. На стадии резистентности происходила стабилизация протеолитической активности крови. Однако при длительном стрессе (стадия истощения) она снова достоверно возрастала на фоне снижения активности ингибиторов протеаз, что свидетельствует об истощении защитного ингибиторного резерва. У животных с гипотиреозом на всех стадиях развития стресс-реакции имело место достоверное повышение протеолитической активности крови, причем показатели ингибиторов протеаз достоверно уменьшались. Это приводило к резкому возрастанию индекса протеолиза, что происходило на фоне увеличения проницаемости лизосомальных мембран.

Вывод. На фоне гипотиреоза наблюдают более интенсивное, чем в эутиреоидных животных, возрастание протеолитической активности крови на фоне угнетения антипротеазной активности и увеличения проницаемости лизосомальных мембран.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стресс; гипотиреоз; протеиназо-ингибиторная система; лизосомальные мембраны.

O. E. Lyubovich, I. M. Klishch, A. S. Volska, Kh. I. Kurylo
I. HORBACHEVSKY TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

STATE OF THE PROTEINASE/INHIBITOR SYSTEM IN RATS IN THE DYNAMICS OF IMMOBILIZATIONAL STRESS ON THE BACKGROUND OF HYPOTHYROIDISM

Summary

Introduction. In the pathogenesis of many pathological conditions, the violation of the proteinase-inhibitor system is important. In the absence of proper control of proteolysis, a number of pathological conditions, accompanied by the appearance of destructive, inflammatory and immune responses, develops. A number of researchers have established the protective effect of iodine-containing thyroid hormones in stress, realized as a result of their interaction with the cell genome, which leads to stimulation of local stress-limiting systems.

The aim of the study – to establish the peculiarities of the functioning of the proteinase system/proteinase inhibitors under conditions of immobilization stress against the background of reduction of the level of iodine-containing hormones of the thyroid gland.

Research Methods. Hypothyroidism was modeled daily by the introduction of per os tireostatics of Mercazolil (Zdorovia, Ukraine) at a dose of 25 mg/kg during the 21st day. Acute immobilization was modeled by binding the experimental rats to the back on the 4 limbs without limiting the mobility of the head for a duration of 3 hours. Spectrophotometric and immuno-enzymatic methods were used to study the concentration of iodine-containing hormones of the thyroid gland, the activity of the proteinase system and the content of proteolytic inhibitors.

Results and Discussion. The effect of immobilization stress in rats with pre-modeled hypothyroidism on the parameters of the proteinase-inhibitory system of blood has been investigated. At the stage of the anxiety of the development of the stress reaction in euthyroid animals, an increase in the proteolytic activity of the blood was observed against the background of an increase in the content of α 1-inhibitor proteases and α 2-macroglobulin, indicating an increase in antiproteolytic potential to inhibit the development of degradation. At the stage of resistance there is a stabilization of proteolytic activity of the blood. However, with prolonged stress (depletion stage), the proteolytic activity of blood again significantly increases with the decrease in the activity of protease inhibitors, indicating the depletion of protective inhibitory reserve. In animals with hypothyroidism, at all stages of the development of a stress reaction, there is a significant increase in proteolytic activity of the blood, and the rates of protease inhibitors are significantly reduced. This leads to a sharp increase in the index of proteolysis, which occurs against the background of increased permeability of lysosomal membranes.

Conclusion. Against the background of hypothyroidism, more intense than euthyroid animals, an increase in the proteolytic activity of blood against the backdrop of inhibition of antiproteolytic activity and an increase in the permeability of lysosomal membranes is observed.

KEY WORDS: **stress; hypothyroidism; proteinase-inhibitor system; lysosomal membranes.**

Отримано 07.08.18

Адреса для листування: І. М. Кліщ, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: klishch@tdmu.edu.ua.