

УДК [612.018:612.44:[577.152.34:612.017.2]
©Городецкая, Гусакова

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА СИСТЕМУ ПРОТЕИНАЗЫ/ИНГИБИТОРЫ ПРИ СТРЕССЕ

И.В. Городецкая, Е.А. Гусакова*

Витебский государственный медицинский университет,
Беларусь, 210015, Витебск, пр-т Фрунзе, 27; эл. почта: gorodecka-iv@mail.ru

Стадия тревоги стресс-реакции (через 1 ч после стресса, моделируемого плаванием крыс в клетке в течение 1 ч) характеризуется стимуляцией трипсиноподобной активности (ТпА) в печени и, особенно, в крови. В стадию резистентности (через 48 ч после стресса) происходит нормализация ТпА в крови и ограничение её возрастания в печени. В стадию истощения стресс-реакции (стрессирование по 1 ч в течение 10 сут.) развивается наиболее значительное увеличение ТпА в печени и в крови. Экспериментальный гипотиреоз (25 мг/кг мерказолила, 20 сут.), *per se* вызывающий уменьшение ТпА, определяет более выраженную стимуляцию протеолиза в стадию тревоги, препятствует его нивелированию в стадию резистентности, а в стадию истощения способствует его избыточной активации. Введение L-тироксина в “малых” дозах (1,5-3,0 мкг/кг, 28 сут.) само по себе не влияет на систему протеолиза, в стадии тревоги и истощения – лимитирует увеличение ТпА, в стадию устойчивости – предупреждает её стимуляцию. Зависимость изменений в системе протеиназы/ингибиторы при стрессе от уровня йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови связана с их влиянием на активность эндогенных ингибиторов протеиназ (α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина) и проницаемость лизосомальных мембран.

Ключевые слова: йодсодержащие тиреоидные гормоны, протеолиз, стресс.

DOI: 10.18097/PBMC20156103389

ВВЕДЕНИЕ

Установлена активация протеолитических процессов при стрессе [1]. Неуправляемый протеолиз вызывает деструкцию и гибель клеток [2]. Одной из причин этих негативных для судьбы клетки последствий является снижение активности эндогенных ингибиторов протеиназ и повышение проницаемости лизосомальных мембран [3], прежде всего клеток печени. С другой стороны, доказано антистрессорное действие йодсодержащих тиреоидных гормонов (ЙТГ), которое реализуется в результате их взаимодействия с клеточным геномом, это приводит к стимуляции локальных стресс-лимитирующих систем – белков теплового шока и антиоксидантных ферментов [4]. Однако значение ЙТГ в изменениях протеолиза, вызванных стрессом, до сих пор не исследовалось.

Цель данной работы – оценить возможное влияние ЙТГ на систему протеиназы/ингибиторы и проницаемость лизосомальных мембран гепатоцитов при стрессе.

МЕТОДИКА

Опыты поставлены на 182 половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 220-250 г в осенне-зимний период. При содержании животных и при проведении экспериментов с ними соблюдались принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Крысы были разделены на 13 групп (по 7 особей в каждой): 1 – интактные; 2 – контроль (внутрижелудочное введение 1% крахмального клейстера); 3, 4, 5 – животные, получавшие 1% крахмальный клейстер, подвергнутые СПК в течение 1 ч и взятые в эксперимент через 1 ч (стадия тревоги), 48 ч после стресса (стадия устойчивости) и после стресса по 1 ч в течение 10 сут. (стадия истощения); 6 – крысы, получавшие мерказолил (ООО “Фармацевтическая компания “Здоровье”, Украина) (25 мг/кг внутрижелудочно в 1% крахмальном клейстере в течение 20 суток); 7, 8, 9 – получавшие мерказолил животные, подвергнутые СПК и взятые в эксперимент в такие же сроки; 10 – крысы, получавшие “малые”

* - адресат для переписки

ТИРЕОГОРМОНЫ И ПРОТЕОЛИЗ ПРИ СТРЕССЕ

дозы L-тироксина (“Berlin-Chemie AG”, Германия) (1,5-3,0 мкг/кг внутривенно в 1% крахмальном клейстере в течение 28 суток); 11, 12, 13 – получавшие L-тироксин животные, подвергнутые стрессу и взятые в эксперимент в указанные сроки. Крыс забивали декапитацией под уретановым наркозом (1 г/кг массы тела). Концентрацию ЙТГ в крови – общих трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4), их свободных фракций ($T_{3св}$ и $T_{4св}$) – определяли радиоиммунологически с помощью наборов реактивов РИА- T_3 -СТ, РИА- T_4 -СТ (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), RIA FT3, RIA FT4 (IMMUNOTECH, “Beckman Coulter Company”, Чехия). Состояние системы протеолиза оценивали по трипсиноподобной активности (ТпА) и активности основных ингибиторов протеиназ (α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ)) в печени и крови, которые исследовали по Карягиной и соавт. [6]. Рассчитывали индекс протеолиза (ИП), отражающий напряжённость или “управляемость” протеолитических процессов, как отношение ТпА к суммарной ингибиторной емкости (сумма активности α_1 -АТ и α_2 -МГ) [7]. Проницаемость мембран лизосом гепатоцитов оценивали по относительной свободной активности маркерного фермента лизосомального

матрикса – катепсина Д [8]. Указанный показатель представляет собой долю свободной активности в общей, выраженную в процентах. Свободную активность определяли в гомогенате ткани печени, содержащем неразрушенные лизосомы, после инкубации с гемоглобином при 37°C в течение 30 мин. Общую активность исследовали после добавления детергента тритон X-100, разрушающего мембраны лизосом, и полного освобождения катепсина Д. Содержание белка в печени определяли по Лоури [9]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы “Статистика 6.0”. Поскольку после первоначального определения характера распределения признака (тест Шапиро-Уилкса) было установлено, что оно отличалось от нормального, далее при попарном сравнении использовали непараметрический метод (U-тест Манна-Уитни). Результаты представляли в виде Me (LQ; UQ) (Me – медиана, (LQ; UQ) – интерквартильный интервал: верхняя граница нижнего квартиля (LQ) и нижняя граница верхнего квартиля (UQ)). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты работы приведены в таблицах 1-3.

Таблица 1. Влияние изменения тиреоидного статуса на концентрацию йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови при стрессе.

Группа животных (n=7)	T_3 , нМ	T_4 , нМ	$T_{3св}$, пМ	$T_{4св}$, пМ	ТТГ, мМЕ/л
1. Интактные	1,651 (1,574; 1,689)	67,097 (62,367; 73,592)	3,717 (3,582; 4,145)	13,869 (13,099; 14,815)	0,187 (0,173; 0,265)
2. Контроль	1,608 (1,577; 1,652)	70,162 (61,862; 72,161)	4,05 (3,701; 4,425)	13,902 (13,294; 15,071)	0,196 (0,172; 0,245)
3. Стадия тревоги	2,029* (1,992; 2,125)	90,04* (87,368; 90,713)	6,64* (6,098; 7,057)	21,378* (18,822; 22,765)	0,066* (0,063; 0,068)
4. Стадия устойчивости	1,639 (1,592; 1,695)	68,938 (61,946; 73,294)	3,747 (3,581; 4,057)	13,746 (13,087; 14,836)	0,182 (0,176; 0,248)
5. Стадия истощения	1,294* (1,184; 1,352)	52,997* (52,02; 53,993)	2,945* (2,537; 3,073)	9,028* (8,454; 9,231)	0,511* (0,487; 0,527)
6. Мерказолил	1,261* (1,196; 1,324)	57,872* (55,682; 59,743)	2,807* (2,716; 2,815)	10,096* (10,008; 10,25)	0,37* (0,345; 0,38)
7. Мерказолил + стадия тревоги	1,055 о+ (0,993; 1,099)	50,034 о+ (49,873; 50,553)	2,245 о+ (2,178; 2,281)	7,258 о+ (7,052; 7,754)	0,129 о+ (0,111; 0,132)
8. Мерказолил + стадия устойчивости	1,089 о+ (1,058; 1,106)	52,568 о+ (52,178; 52,925)	2,358 о+ (2,328; 2,399)	7,81 о+ (7,339; 7,887)	0,116 о+ (0,111; 0,128)
9. Мерказолил + стадия истощения	0,97 о+ (0,884; 0,992)	34,604 о+ (33,874; 35,656)	2,025 о+ (1,996; 2,083)	4,261 о+ (4,042; 4,925)	0,097 о+ (0,094; 0,101)
10. L-Тироксин	1,624 (1,596; 1,675)	68,034 (62,897; 73,741)	3,872 (3,558; 4,218)	14,212 (13,377; 15,323)	0,185 (0,153; 0,253)
11. L-Тироксин + стадия тревоги	1,878 ^+ (1,852; 1,924)	81,733 ^+ (80,307; 83,113)	5,475 ^+ (4,892; 5,514)	17,979 ^+ (17,375; 18,258)	0,084 ^+ (0,075; 0,088)
12. L-Тироксин + стадия устойчивости	1,601 (1,57; 1,718)	70,615 (61,632; 71,796)	4,062 (3,640; 4,288)	13,881 (13,313; 15,44)	0,18 (0,159; 0,265)
13. L-Тироксин + стадия истощения	1,416 ^+ (1,391; 1,475)	57,171 ^+ (55,213; 59,622)	3,452 ^+ (3,436; 3,473)	10,294 ^+ (9,969; 10,496)	0,436 ^+ (0,411; 0,459)

Примечание. Здесь и в таблицах 2 и 3: обозначение достоверности различий ($p < 0,05$) по отношению: * - к контролю, # - к соответствующей стадии стресса, + - к контролю и стрессу, ° - к группе животных, получавших мерказолил, ^ - к группе животных, получавших L-тироксин.

Таблица 2. Влияние изменения тиреоидного статуса на трипсиноподобную активность, активность α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в печени и крови при стрессе.

Группа животных (n=7)	Печень			Кровь		
	ТпА, нмоль/чх мг белка	Активность α_1 -АТ, мкмоль/сх мг белка	Активность α_2 -МГ, пмоль/сх мг белка	ТпА, нмоль/схл	Активность α_1 -АТ, мкмоль/схл	Активность α_2 -МГ, мкмоль/схл
1. Интактные	51,169 (48,894; 55,106)	5,124 (5,046; 5,569)	33,108 (32,059; 35,022)	33,693 (21,526; 35,565)	5,432 (5,138; 5,621)	0,407 (0,312; 0,622)
2. Контроль	50,071 (48,045; 52,641)	5,216 (5,094; 5,425)	32,728 (32,165; 33,516)	31,353 (23,398; 35,565)	5,507 (5,294; 5,573)	0,486 (0,424; 0,528)
3. Стадия тревоги	61,581* (56,131; 64,041)	6,463* (5,970; 6,587)	28,554* (27,863; 29,308)	41,648* (38,373; 43,988)	5,381 (5,135; 5,588)	0,624* (0,618; 0,701)
4. Стадия устойчивости	54,061* (52,067; 57,364)	5,842* (5,635; 5,943)	30,142* (29,532; 30,525)	30,885 (27,610; 32,289)	5,36 (5,192; 5,540)	0,564* (0,549; 0,614)
5. Стадия истощения	68,966* (65,082; 74,073)	3,161* (2,963; 3,852)	25,304* (23,667; 26,428)	47,732* (44,924; 54,751)	3,894* (3,699; 4,071)	0,318* (0,261; 0,324)
6. Мерказолил	44,309* (39,032; 48,204)	4,546* (4,412; 4,916)	29,176* (28,616; 30,443)	23,866* (19,186; 26,206)	4,851* (4,347; 4,982)	0,401* (0,335; 0,454)
7. Мерказолил + стадия тревоги	64,336 о+ (62,950; 69,183)	3,166 о+ (3,049; 3,762)	23,716 о+ (22,361; 27,110)	44,456 о+ (43,052; 51,008)	3,870 о+ (3,639; 3,996)	0,313 о+ (0,192; 0,332)
8. Мерказолил + стадия устойчивости	60,180 о+ (58,381; 63,023)	3,435 о+ (3,264; 3,907)	24,401 о+ (21,938; 26,690)	41,180 о+ (39,309; 43,988)	3,651 о+ (3,450; 3,978)	0,298 о+ (0,239; 0,334)
9. Мерказолил + стадия истощения	78,321 о+ (73,910; 79,119)	1,919 о+ (1,832; 2,036)	19,218 о+ (17,402; 21,418)	58,027 о+ (54,283; 61,303)	2,233 о+ (1,706; 2,650)	0,158 о+ (0,126; 0,206)
10. L-Тироксин	51,445 (49,076; 55,021)	5,432 (5,314; 5,521)	33,115 (32,647; 34,019)	27,142 (24,802; 33,225)	5,42 (5,369; 5,522)	0,464 (0,395; 0,465)
11. L-Тироксин + стадия тревоги	55,293 ^+ (52,174; 57,069)	5,834 ^+ (5,732; 6,112)	34,919 ^+ (34,634; 35,137)	36,501 ^+ (35,565; 36,969)	6,095 ^+ (5,966; 6,281)	0,552 ^+ (0,504; 0,586)
12. L-Тироксин + стадия устойчивости	50,308 # (49,130; 52,935)	5,584 # (5,217; 5,669)	33,619 # (32,654; 34,012)	29,949 (25,738; 31,821)	5,783 ^+ (5,750; 5,849)	0,529 ^+ (0,520; 0,532)
13. L-Тироксин + стадия истощения	60,825 ^+ (56,982; 63,684)	4,121 ^+ (4,054; 4,354)	28,527 ^+ (27,930; 29,433)	40,245 ^+ (37,437; 42,584)	4,395 ^+ (3,957; 4,548)	0,381 ^+ (0,365; 0,404)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами установлено, что стадия тревоги стресс-реакции характеризуется сложной реакцией организма на уровне регуляции системы протеиназы/ингибиторы – стимуляцией протеолиза в печени и, особенно, в крови, в ответ на которую в последней повышается активность α_2 -МГ, а в печени изменяется активность обоих протеиназных ингибиторов, однако разнонаправленно. Увеличение активности α_1 -АТ и уменьшение таковой α_2 -МГ в печени в указанный период времени может свидетельствовать о том, что выброс α_2 -МГ из печени в кровь является более быстрым (в течение 1 ч) процессом, тогда как выброс α_1 -АТ – более отложенным во времени. Это объясняет обнаруженное нами повышение активности только α_2 -МГ в крови в указанный период. Повышение относительной свободной активности катепсина Д, которое является маркером лабильности мембран лизосом, позволяет заключить, что проницаемость лизосомальных мембран в стадию тревоги стресс-реакции увеличивается. Стадия резистентности приводит к нормализации протеолитической активности в крови и к ограничению её возрастания в печени, как и изменения активности α_2 -МГ в крови и обоих ингибиторов протеиназ в печени. Развивающаяся

в этот период тенденция к нормализации относительной свободной активности катепсина Д указывает на стабилизацию лизосомальных мембран в этот период. В стадию истощения стресс-реакции, как и в стадию тревоги, ТпА увеличивается и в печени, и в крови, однако намного более значительно. При этом не только не происходит компенсаторно-обусловленного роста активности протеиназных ингибиторов, а, напротив, наблюдается её снижение: в печени уменьшается преимущественно активность α_1 -АТ, а в крови – активность α_2 -МГ. Возможно это отражает различный вклад указанных ингибиторов в регуляцию системы протеолиза в этих условиях. Рост относительной свободной активности катепсина Д указывает на то, что проницаемость лизосомальных мембран в стадию истощения вновь возрастает.

Экспериментальный гипотиреоз *per se* вызывает уменьшение протео- и антипротеиназной активности, как и стабильности мембран лизосом. В стадию тревоги он определяет более выраженную стимуляцию протеолиза в печени и крови, обусловленную падением активности ингибиторов протеиназ, то есть смещает динамическое равновесие в системе протеолиза в сторону протеолитических ферментов, что приводит

ТИРЕОГОРМОНЫ И ПРОТЕОЛИЗ ПРИ СТРЕССЕ

Таблица 3. Влияние изменения тиреоидного статуса на общую, свободную и относительную свободную активность катепсина Д.

Группа животных (n=7)	Активность катепсина Д		
	Общая, нмоль тирозина/мин×мг белка	Свободная, нмоль тирозина /мин×мг белка	Относительная свободная, %
1. Интактные	3,768 (3,698; 3,918)	0,531 (0,522; 0,581)	14,12 (13,55; 15,60)
2. Контроль	3,852 (3,657; 3,901)	0,581 (0,563; 0,594)	15,11 (14,43; 16,24)
3. Стадия тревоги	3,678 (3,648; 3,717)	0,704 * (0,693; 0,730)	19,08 * (18,76; 19,68)
4. Стадия устойчивости	3,733 (3,686; 3,759)	0,639 * (0,618; 0,684)	17,30 * (16,42; 18,56)
5. Стадия истощения	4,198 * (4,150; 4,231)	0,904 * (0,846; 0,917)	21,53 * (20,12; 21,67)
6. Мерказолил	3,183 * (3,153; 3,275)	0,519 * (0,512; 0,571)	16,31 * (16,03; 17,77)
7. Мерказолил + стадия тревоги	4,019 о+ (3,998; 4,113)	0,870 о+ (0,827; 0,883)	21,15 о+ (20,09; 22,38)
8. Мерказолил + стадия устойчивости	4,031 о+ (4,000; 4,066)	0,827 о+ (0,765; 0,834)	20,22 о+ (19,13; 21,11)
9. Мерказолил + стадия истощения	4,383 о+ (4,344; 4,477)	1,137 о+ (1,094; 1,211)	25,77 о+ (24,60; 27,64)
10. L-Тироксин	3,895 (3,875; 3,929)	0,563 (0,514; 0,569)	14,25 * (13,19; 14,58)
11. L-Тироксин + стадия тревоги	3,737 (3,681; 3,890)	0,623 ^+ (0,605; 0,671)	16,68 ^# (15,55; 17,91)
12. L-Тироксин + стадия устойчивости	3,866 (3,694; 3,886)	0,551 # (0,513; 0,583)	14,25 # (13,51; 15,19)
13. L-Тироксин + стадия истощения	3,950 *# (3,925; 3,957)	0,694 ^+ (0,661; 0,711)	17,58 ^+ (16,41; 18,00)

к существенному увеличению ИП и способствует большему повышению относительной свободной активности катепсина Д, свидетельствующему о более значительном, чем у эутиреоидных крыс, возрастании проницаемости мембран лизосом. В стадию резистентности экспериментальный гипотиреоз препятствует ограничению изменений активности протеолитических ферментов и их ингибиторов и стабилизации лизосомальных мембран, имевших место у эутиреоидных животных. В стадию истощения он способствует наиболее существенным нарушениям регуляторных взаимоотношений в системе протеолитические ферменты/их ингибиторы, что проявляется в избыточной активации протеолиза вследствие глубокого угнетения активности ингибиторов протеиназ, и обуславливает наиболее значительное увеличение относительной свободной активности катепсина Д, что доказывает существенное уменьшение устойчивости мембран лизосом.

Введение L-тироксина в малых дозах само по себе не вызывает изменения изученных нами показателей системы протеолиза и приводит к снижению относительной свободной активности катепсина Д, что указывает на стабилизацию под его влиянием лизосомальных мембран. В стадию тревоги стресс-реакции L-тироксин лимитирует увеличение ТпА в крови и в печени в результате стимуляции активности ингибиторов протеолитических

ферментов и ограничения увеличения проницаемости мембран лизосом. Меньшее возрастание активности α_1 -АТ в печени и α_2 -МГ в крови по сравнению со стрессированными животными, не получавшими L-тироксин, возможно связано с меньшей активацией протеолиза в этих условиях. В стадию устойчивости стресс-реакции L-тироксин предупреждает стимуляцию ТпА, падение активности α_2 -МГ в печени и, наряду с этим, обеспечивает возрастание активности α_1 -АТ в крови и устраняет повышение относительной свободной активности катепсина Д, то есть стабилизирует лизосомальные мембраны. В стадию истощения стресс-реакции L-тироксин минимизирует активацию протеолиза в печени и крови, поскольку устраняет депрессию антипротеиназной активности и ограничивает рост относительной свободной активности катепсина Д, что указывает на снижение проницаемости мембран лизосом под воздействием L-тироксина в этих условиях.

Таким образом, нами выявлена зависимость изменений в системе протеиназы/ингибиторы при стрессе от уровня йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови, связанная с их влиянием на активность эндогенных ингибиторов протеиназ (α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина) и проницаемость лизосомальных мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сувернев А.В. (2007) Основы безопасности пиковой гипертермии, Академическое из-во "Гео", Новосибирск.
2. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. (1988) Протеолиз в норме и при патологии, Здоров'я, К.
3. Пупышев А.Б. (2011) Цитология, **53**, 313-324.
4. Малышев И.Ю., Голубева Л.Ю., Божко А.П., Городецкая И.В. (2000) Рос. физиол. журн., №1, 62-67.
5. Бондаренко С.Н., Бондаренко Н.А., Манухина Е.Б. (1999) Бюл. эксперим. биол. мед., **128**, 157-160.
6. Карягина И.Ю., Зарембский Р.А., Балябина М.Д. (1990) Лаб. дело., №2, 10-13.
7. Дедуль М.И., Радецкая Л.Е., Кирпиченко Л.Н. (2006) Новости хирургии, **3**, 74-80.
8. Серебров В.Ю., Суханова Г.А. (2008) Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов, СГМУ, Томск.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.

Поступила: 10. 10. 2013.

EFFECT OF THE THYROID STATUS ON THE PROTEINASES/INHIBITORS SYSTEM UNDER STRESS

I.V. Gorodetskaya, E.A. Gusakova

Vitebsk State Medical University,
27 Frunze Av., Vitebsk, 210015 Belarus; e-mail:gorodecka-iv@mail.ru

The alarm-stage of stress reaction (an hour after the stress of swimming of rats in a cage during an hour) is characterized by the stimulation of trypsin-like activity (TLA) in the liver, and especially in the blood. At the resistance stage (48 hours after the stress) there is normalization of TLA in the blood and limitation of its growth in the liver. At the stage of exhaustion (an hour of stress during 10 days) the most significant increase of TLA in the liver and blood develops. Experimental hypothyroidism (25 mg/kg merkazolil within 20 days) *per se* causes a reduction of TLA, defines more pronounced stimulation of proteolysis in the alarm-stage, prevents its normalization at the resistance-stage, and promotes its excessive activation at the stage of exhaustion. Introduction of small doses of L-thyroxine (1.5-3.0 g/kg during 28 days) does not affect the system of proteolysis, limits the increase of TLA at the alarm- and exhaustion stages, prevents its stimulation at the resistance-stage. The dependence of the changes in the proteases/inhibitors system under stress from the level of iodine-containing thyroid hormones in the blood is due to their influence on the activity of endogenous proteinase inhibitors (α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin) and on the permeability of lysosomes membranes.

Key words: iodine-containing thyroid hormones, proteolysis, stress.