

МЕХАНИЗМЫ ОГРАНИЧЕНИЯ ЙОДСОДЕРЖАЩИМИ ТИРЕОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ СТИМУЛЯЦИИ ПРОТЕОЛИЗА ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Гусакова Е. А., Городецкая И. В.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Реферат. В опытах на 240 крысах-самцах массой 220–250 г, получавших, с одной стороны, мерказолил (25 мг/кг 20 дней), с другой, малые дозы L-тироксина (1,5–3 мкг/кг 28 дней), установлено, что йодсодержащие тиреоидные гормоны ограничивают стимуляцию протеолиза (минимизируют повышенные активности трипсиноподобных протеиназ в печени и крови крыс) в условиях острого (плавание животных в стандартной пластиковой клетке в течение 1 ч) и хронического (плавание в указанном режиме в течение 20 дней) стресса. В основе обнаруженного эффекта лежат минимизация нарушения микростроения печени (дистрофических и некротических повреждений гепатоцитов, уменьшения кровенаполнения синусоидных капилляров, нарушения микроциркуляции) и ограничение активации перекисного окисления липидов (накопления диеновых конъюгатов и малонового диальдегида) в печени и крови. Результаты открывают новый аспект антистрессорного эффекта йодсодержащих гормонов щитовидной железы — нормализацию функции системы протеиназы/ингибиторы в этих условиях.

Ключевые слова: йодсодержащие тиреоидные гормоны, протеолиз, стресс.

Введение. Протеолитические ферменты участвуют в регуляции практически всех функций организма [1]. Однако при стрессе протеиназы из фактора регуляции превращаются в фактор повреждения и могут вызывать деструкцию и гибель клеток. С другой стороны, известно существенное значение йодсодержащих тиреоидных гормонов (далее — ЙТГ) в антистресс-системе организма, обусловленное их стимулирующим воздействием на активность локальных стресс-лимитирующих систем [2]. Однако механизм стресс-протекторного эффекта ЙТГ, связанный с их влиянием на активность протеолитических ферментов, не установлен. Не до конца исследована и роль йодсодержащих гормонов щитовидной железы в реакциях организма при остром и хроническом действии стресс-факторов.

Цель работы — определение влияния тиреоидного статуса организма на интенсивность протеолитических процессов при остром и хроническом стрессе и раскрытие его механизмов, связанных с воздействием ЙТГ на микроструктуру печени и перекисное окисление липидов.

Материалы и методы. Опыты поставлены на 240 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 220–250 г. Тиреоидный статус изменяли внутрижелудочным введением в 1 % крахмальном клейстере мерказолила (ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина) (25 мг/кг 20 сут) или введением L-тироксина (Berlin-Chemie AG, «Менарини Групп», Германия) в малых дозах (1,5–3,0 мкг/кг 28 сут). Контрольные животные, также как и подвергнутые затем стрессу без применения препаратов, получали 1 % крахмальным клейстер в течение такого же срока. Острый стресс моделировали по методике «свободного плавания в клетке» (далее — СПК) [3] в течение 1 ч, хронический — СПК по 1 ч в течение 10 дней. Животных забивали декапитацией под уретановым наркозом (1 г/кг массы тела). Концентрацию ЙТГ в крови — общих трийодтиронина (Т₃) и тироксина (Т₄), их свободных фракций (Т₃св и Т₄св), тиреотропного гормона (ТТГ) — определяли радиоиммунологически с помощью наборов реактивов РИА-Т₃-СТ, РИА-Т₄-СТ, ИРМА-ТТГ-СТ (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), RIA FT₃, RIA FT₄ (IMMUNOTECH, A Beckman Coulter Company, Чехия). Состояние системы протеолиза определяли по трипсиноподобной активности (далее — ТпА) в печени и крови [4]. Микростроение пече-

ни крыс исследовали с помощью микроскопа Leica DM 2000 с видеопроекционной системой при увеличении $\times 630$. В каждом препарате, окрашенном гематоксилином и эозином, в 5 полях зрения изучали морфологические изменения гепатоцитов и состояние кровенаполнения синусоидных капилляров. Дистрофические изменения гепатоцитов оценивали следующим образом: 0 — отсутствуют, 1 балл — легкая степень (очаговая дистрофия), 2 балла — умеренная степень (очагово-диффузная дистрофия), 3 балла — тяжелая степень (диффузная гидропическая дистрофия). Интенсивность некротических изменений гепатоцитов измеряли в баллах: 0 — нет, 1 — некроз единичных клеток, 2 — очаговый некроз, 3 — обширный центроглобулярный некроз [5]. Состояние кровенаполнения синусоидных капилляров выражали в баллах: 0 — нет изменений, 1 — слабые изменения (в 1–2 полях зрения), 2 — умеренные изменения (в 3–4 полях зрения), 3 — выраженные изменения (во всех полях зрения) [6]. ПОЛ в печени и крови характеризовали по концентрации некоторых начальных — диеновых конъюгатов (далее — ДК) и одного из конечных — малонового диальдегида (далее — МДА) [7]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Концентрация T_3 в крови интактных крыс составила 1,65 (1,57; 1,69) нмоль/л, T_4 — 67,10 (62,37; 73,59) нмоль/л, $T_{3св}$ — 3,72 (3,58; 4,15) пмоль/л, $T_{4св}$ — 13,87 (13,10; 14,82) пмоль/л, ТТГ — 0,19 (0,17; 0,27) мМЕ/л. ТпА в печени была равна 51,160 (48,894; 55,109) нмоль/ч \times мг белка, в крови 33,693 (21,526; 35,565) нмоль/с \times л. В гистологических препаратах печени крыс интактной группы отмечалось четкое балочно-радиальное строение печеночных долек. Границы клеток выявлялись отчетливо. Ядра гепатоцитов располагались в центре. Состояние кровенаполнения внутридольковых синусоидных капилляров соответствовало норме. Дистрофические изменения гепатоцитов и их некроз не определялись. Строма портальных трактов и паренхима печени были без признаков инфильтрации. В печени концентрация ДК составила 3,254 (3,127; 3,287) нмоль/мг липидов, МДА — 2,376 (2,287; 3,294) нмоль/мг белка, в крови ДК — 0,585 (0,542; 0,609) нмоль/мг липидов, МДА — 0,0537 (0,0521; 0,0563) нмоль/мг белка. Введение 1 % крахмального клейстера не оказало влияния на все изученные нами показатели.

Острый стресс вызвал увеличение концентрации ЙТГ в крови, особенно их свободных фракций: T_3 — на 26 % ($p < 0,01$), T_4 — на 28 % ($p < 0,01$), $T_{3св}$ — на 64 % ($p < 0,01$), $T_{4св}$ — на 54 % ($p < 0,01$). В ответ на повышение сывороточного уровня ЙТГ содержание ТТГ снижалось — на 66 % ($p < 0,01$). Наблюдалась стимуляция протеолиза — ТпА в печени возрастала на 23 % ($p < 0,01$), в крови — на 33 % ($p < 0,01$). У 70 % крыс развивались дистрофические изменения гепатоцитов, которые проявлялись в набухании клеток, сглаживании межклеточных границ. При этом у 60 % животных наблюдалась очаговая (1 балл), у 10 % — очагово-диффузная (2 балла, $p < 0,05$) дистрофия. Также у 60 % животных отмечалось полнокровие синусоидных капилляров (1 балл, $p < 0,05$). Наблюдалась и стимуляция ПОЛ — уровень ДК в печени повышался на 35 % ($p < 0,01$), МДА — на 37 % ($p < 0,01$). В крови концентрация ДК и МДА увеличилась менее существенно — на 27 ($p < 0,01$) и 30 % ($p < 0,01$).

При хроническом стрессе в отличие от острого происходило снижение сывороточного уровня ЙТГ: T_3 — на 20 % ($p < 0,01$), T_4 — на 24 % ($p < 0,01$), $T_{3св}$ — на 27 % ($p < 0,01$), $T_{4св}$ — на 35 % ($p < 0,01$). В ответ на это концентрация ТТГ возрастала — на 161 % ($p < 0,01$), что указывает на сохранение нормальных регуляторных взаимоотношений в системе гипофиз–щитовидная железа. По сравнению с острым стрессом стимуляция протеолиза была более выражена: ТпА в печени повышалась на 38 % ($p < 0,01$) (на 15 % больше), в крови — на 52 % ($p < 0,01$) (на 19 % больше). Повреждение гистоструктуры печени также было большим: дистрофические изменения гепатоцитов наблюдались у 100 % крыс, их тяжесть составляла 1 балл у 70 % животных и 2 балла у 30 % ($p < 0,001$). Полнокровие синусоидных капилляров регистрировалось у 90 % крыс и имело выраженность 1 балл у 50 % животных и 2 балла — у 40 % ($p < 0,001$). В синусоидных капиллярах отмечались явления застоя крови и сладж-феномен. В отличие от острого стресса у 70 % крыс развивались некротические изменения гепатоцитов, проявляющиеся в исчезновении границ между клетками и лизисе отдельных ядер. При этом у 60 % животных наблюдался некроз единичных клеток (1 балл), у 10 % — очаговый некроз в пределах дольки (2 балла) ($p < 0,01$). Выявлялась и слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация (в основном лимфоцитами и макрофагами), которая локализовалась в дольке печени, в области портальных трактов и по ходу синусоидных капилляров. Более значительной была и активация ПОЛ: в печени уровень ДК возрастал на 59 % ($p < 0,01$), МДА — на 49 % ($p < 0,01$) (на 24 и 12 % больше), в крови — на 49 ($p < 0,01$) и 42 % ($p < 0,01$) (на 22 и 12 % больше).

Введение мерказолила вызвало уменьшение сывороточного содержания ЙТГ: T_3 — на 22 % ($p < 0,01$), T_4 — на 18 % ($p < 0,01$), $T_{3св}$ — на 31 % ($p < 0,01$), $T_{4св}$ — на 27 % ($p < 0,01$) и, напротив, возрастание концентрации ТТГ — на 89 % ($p < 0,01$), что свидетельствует о развитии у экспериментальных животных гипотиреоидного состояния. Наблюдалось некоторое снижение интенсивности протеолиза: ТпА в печени падала на 12 % ($p < 0,05$), в крови — на 24 % ($p < 0,05$). Отмечалось нарушение микрострук-

туры печени: у 80 —% животных выявлялись некротические изменения гепатоцитов в виде разрушения плазмолеммы и кариолизиса, захватывающие единичные клетки (1 балл, $p < 0,01$) и локализующиеся в периферической зоне печеночной дольки. При этом дистрофические изменения гепатоцитов отсутствовали ($p > 0,05$), что, вероятно, объясняется быстрым переходом дистрофии в некроз. У 60 % гипотиреоидных крыс регистрировалось полнокровие синусоидных капилляров (1 балл, $p < 0,05$) с явлениями застоя в них. В дольке печени и по ходу синусоидных капилляров наблюдалась слабо выраженная инфильтрация, преимущественно сегментоядерными нейтрофилами. Содержание продуктов ПОЛ в крови и особенно в печени снижалось: ДК — на 12 ($p < 0,01$) и 14 % ($p < 0,01$), МДА — на 22 ($p < 0,01$) и 26 % ($p < 0,01$) соответственно.

При остром стрессе у крыс, получавших мерказолил, концентрация ЙТГ в крови в отличие от стресса у эутиреоидных животных падала: по отношению к группе «Мерказолил» Т₃ — на 12 % ($p < 0,01$), Т₄ — на 11 % ($p < 0,01$), Т_{3св} — на 14 % ($p < 0,01$), Т_{4св} — на 21 % ($p < 0,01$). Несмотря на это, сывороточное содержание ТТГ не увеличивалось, а, напротив, снижалось на 123 %. Это свидетельствует о нарушении функционирования короткой петли обратной связи в гипофизарно-тиреоидной системе. Активация протеолиза была более существенной, чем у эутиреоидных животных: ТпА в печени повышалась на 40 % ($p < 0,01$) (т. е. на 17 % больше), в крови — на 66 % ($p < 0,01$, на 33 % больше). Дистрофические изменения гепатоцитов регистрировались уже у 100 % крыс и характеризовались тяжестью 1 или 2 балла (50:50, $p < 0,001$). Полнокровие синусоидных капилляров с явлениями агрегации эритроцитов отмечалось у 90 % крыс и имело выраженность 1 балл у 50 % и 2 балла у 40 % животных ($p < 0,01$). В отличие от эутиреоидных крыс развивались некротические изменения гепатоцитов — такие же, как в группе «Мерказолил» ($p > 0,05$). Наблюдалась диффузная инфильтрация сегментоядерными нейтрофилами и макрофагами вдоль портальных трактов и в дольке печени. Интенсификация ПОЛ также была большей: по отношению к группе «Мерказолил» концентрация ДК в печени и крови возрастала на 45 ($p < 0,01$) и 50 % ($p < 0,01$) (на 10 и 23 % больше), содержание МДА — на 41 ($p < 0,01$) и 35 % ($p < 0,01$) (на 4 и 5 % больше). Преобладание накопления ДК в печени и крови над таковым МДА указывает на наличие деструктивных процессов в клеточных мембранах и свидетельствует о том, что гипотиреоз провоцирует развитие более выраженного дисбаланса механизмов, поддерживающих свободнорадикальный гомеостаз, при стрессе.

Хронический стресс у крыс, получавших мерказолил, привел к более значительному, чем у эутиреоидных, уменьшению уровня ЙТГ в крови: по отношению к группе «Мерказолил» Т₃ — на 18 % ($p < 0,01$), Т₄ — на 33 % ($p < 0,01$), Т_{3св} — на 19 % ($p < 0,01$), Т_{4св} — на 51 % ($p < 0,01$). Несмотря на это, сывороточное содержание ТТГ не возрастало, как это происходило у эутиреоидных животных, а снижалось — на 140 % ($p < 0,01$). Это указывает на развитие существенного дисбаланса в системе гипофиз–щитовидная железа. Стимуляция протеолиза, как и после острого стресса у гипотиреоидных животных, была более значительной, чем у эутиреоидных крыс, перенесших хронический стресс без мерказолила: по сравнению с ее значением в группе «Мерказолил» ТпА в печени повышалась на 68 % ($p < 0,01$) (т. е. на 30 % больше), в крови на 109 % ($p < 0,01$) (на 57 % больше). Изменения микростроения печени также были более существенными: дистрофия гепатоцитов с тяжестью 1 балл наблюдалась у 20 % животных, 2 балла — у 50 % и 3 балла — у 30 % ($p < 0,001$); некроз гепатоцитов — у 100 % животных с тяжестью 1 балл у 50 % крыс и 2 балла также у 50 % животных ($p < 0,05$); полнокровие синусоидных капилляров — у всех крыс с выраженностью 1 балл у 20 %, 2 балла — у 50 % и 3 балла — у 30 % животных ($p < 0,01$). Эндотелиоциты выглядели набухшими, определялся выраженный периваскулярный отек. Регистрировалось расширение перисинусоидальных пространств. В большинстве синусоидных капилляров наблюдались явления застоя и сладжирования. Отмечалась инфильтрация сегментоядерными нейтрофилами, макрофагами и лимфоцитами в области портальных трактов и паренхимы печеночной дольки. Стимуляция ПОЛ также была более значительной, чем у эутиреоидных животных: концентрация ДК и МДА в печени возрастала на 75 ($p < 0,01$) и 58 % ($p < 0,01$) (т. е. на 16 и 9 % больше), в крови — на 62 ($p < 0,01$) и 49 % ($p < 0,01$) (на 13 и 7 % больше).

Введение животным L-тироксина не привело к изменению уровней ЙТГ и ТТГ в крови, как и остальных изученных нами показателей, что позволило охарактеризовать примененные дозы как малые или близкие к физиологическим.

Острый стресс у крыс, получавших L-тироксин, как и у не получавших указанный препарат, приводил к повышению содержания ЙТГ в крови, но в меньшей степени: по сравнению с группой «L-тироксин» Т₃ — на 16 % ($p < 0,01$), Т₄ — на 19 % ($p < 0,01$), Т_{3св} — на 42 % ($p < 0,01$), Т_{4св} — на 27 % ($p < 0,01$). Сывороточная концентрация ТТГ падала, но также менее существенно по сравнению с животными, стрессированными без L-тироксина — на 51 % ($p < 0,01$). L-тироксин ограничивал интенсификацию протеолиза, вызванную острым стрессом: ТпА в печени повышалась только на 7 % ($p < 0,05$) (т. е. на 16 % меньше), в крови — на 29 % ($p < 0,01$) (на 4 % меньше). Микростроение гепатоцитов не отличалось от такового в группе «Тироксин». У 60 % крыс наблюдалась активация кровотока в синусоидных капиллярах с вы-

раженностью 1 балл ($p < 0,05$). Уровень ДК и МДА в печени увеличивался только на 24 ($p < 0,01$) и 28 % ($p < 0,01$), в крови — на 19 ($p < 0,01$) и 21 % ($p < 0,01$), т. е. менее значительно, чем у животных, подвергнутых стрессу без L-тироксина: в печени на 11 и 9 % меньше, в крови — на 8 и 9 %.

При хроническом стрессе у крыс, получавших L-тироксин, сывороточная концентрация ЙТГ падала менее существенно, чем у животных, перенесших такой же стресс без него: содержание T_3 в крови уменьшалось на 13 % ($p < 0,01$), T_4 — на 16 % ($p < 0,01$), $T_{3св}$ — на 22 % ($p < 0,01$), $T_{4св}$ — на 28 % ($p < 0,01$). Сывороточная концентрация ТТГ возрастала, как и после стресса у животных, не получавших L-тироксин, но менее значительно — на 116 % ($p < 0,01$). Как и после острого стресса, L-тироксин минимизировал интенсификацию протеолиза: ТпА в печени и крови увеличивалась лишь на 18 и 41 % ($p < 0,01$) (на 20 и 11 % меньше, чем при стрессе у животных, не получавших L-тироксин). При этом дистрофия гепатоцитов регистрировалась только у 60 % крыс с тяжестью 1 балл ($p < 0,05$); полнокровие синусоидных капилляров наблюдалось также у 60 % животных и характеризовалось выраженностью 1 балл ($p < 0,05$). В отличие от хронического стресса у крыс, не получавших L-тироксин, некротические изменения гепатоцитов не выявлялись, отсутствовали застой крови и сладж-феномен. Наблюдалась и менее выраженная интенсификация ПОЛ: содержание ДК и МДА в печени повышалось лишь на 38 ($p < 0,01$) и 41 % ($p < 0,01$) (т. е. на 21 и 8 % меньше), в крови — на 32 ($p < 0,01$) и 33 % ($p < 0,01$) (на 17 и 9 % меньше). Не было преобладания накопления ДК над таковым МДА, имевшего место у животных, подвергнутых стрессу без L-тироксина.

Заключение. Острый стресс, развивающийся на фоне повышенного сывороточного уровня ЙТГ, вызывает умеренную стимуляцию ТпА, несколько более выраженную в крови. Хронический стресс, вызывающий падение сывороточного содержания ЙТГ, приводит к более значительной интенсификации протеолиза в печени и особенно в крови.

Экспериментальный гипотиреоз, определяющий снижение сывороточного уровня ЙТГ как при остром, так и при хроническом стрессе, и нарушающий функционирование короткой петли обратной связи в системе гипофиз–щитовидная железа, провоцирует более существенную по сравнению с таковой после указанных видов стресса у эутиреоидных крыс активацию протеолиза и в печени, и в крови.

Введение L-тироксина в малых дозах лимитирует изменение сывороточного содержания ЙТГ и ТТГ и вместе с тем ограничивает интенсификацию протеолиза в печени и крови при всех изученных нами воздействиях.

Нами установлены следующие механизмы нормализации ЙТГ системы протеиназы/ингибиторы при стрессе: 1) минимизация активации ПОЛ, продукты которого повреждают целостность клеточных мембран, в т. ч. и лизосомальных; 2) нормализующее влияние на микроструктуру и кровообращение в печени.

Литература

1. Веремеенко, К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. — Киев : Здоров'я, 1988. — 200 с.
2. Роль локальных стресс-лимитирующих систем миокарда в протекторном кардиальном эффекте малых доз тиреоидных гормонов при иммобилизационном стрессе у крыс / И. В. Городецкая [и др.] // Рос. физиол. журн. — 2000. — Т. 86, № 1. — С. 62–67.
3. 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 // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1999. — Т. 128, № 8. — С. 157–160.
4. Карягина, И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, $\alpha 1$ -антитрипсина и $\alpha 2$ -макроглобулина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Карягина, Р. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лаб. дело. — 1990. — № 2. — С. 10–13.
5. Патоморфологические критерии оценки состояния печени у потенциальных доноров со смертью мозга / Л. В. Шкалова [и др.] // Оригинальные исследования. — 2011. — № 4. — С. 7–13.
6. Морфологическая характеристика экспериментального периодонтита / Л. Н. Дедова [и др.] // Стоматол. журн. — 2005. — № 3. — С. 12–18.
7. Орехович, В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. — М. : Медицина, 1977. — 392 с.

MECHANISMS OF LIMITING OF STIMULATION OF PROTEOLISE BY IODINE-CONTAINING HORMONES IN ACUTE AND CHRONIC STRESS

Gusakova E. A., Gorodetskaya I. V.

Educational Establishment "Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University", Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. In experiments on 240 male rats weighing 220–250 g, who received, on the one hand, mercyzolyl (25 mg/kg 20 days), on the other hand, small doses of L-thyroxine (1.5–3 μ g/kg 28 days), it has been established

that iodine-containing thyroid hormones limit the stimulation of proteolysis (minimize the increase in activity of trypsin-like proteinases in the liver and blood of rats) under acute stress (swimming animals in a standard plastic cage for 1 hour) and chronic stress (swimming rats in this regime for 20 days). This effect is based on minimization of liver microstructure damage (dystrophic and necrotic damages of hepatocytes, reduction of blood filling of sinusoidal capillaries, disturbance of microcirculation) and restriction of activation of lipid peroxidation (accumulation of diene conjugates and malonic dialdehyde) in liver and blood. The results open a new aspect of the antistress effect of iodine-containing thyroid hormones — the normalization of the function of the proteinase / inhibitors system under these conditions.

Keywords: iodine-containing thyroid hormones, proteolysis, stress.