

ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ПРОТЕЇНАЗО-ІНГІБІТОРНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ПЕРІОДІВ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ БЛІДОЮ ПОГАНКОЮ

Досліджено вплив токсинів блідої поганки Amanita phalloides на показники протеїназо-інгібіторної системи у щурів різних вікових періодів. У плазмі крові визначали рівень протеолітичної активності крові за даними лізису азоальбуміну, азоказеїну, азоколу; вміст білкових інгібіторів протеолізу – α_2 -макроглобуліну та α_1 -інгібітора протеїназ. Встановлено, що токсичне ураження блідою поганкою призводить до збільшення протеолітичної активності крові на тлі пригнічення інгібіторного потенціалу в усі терміни дослідження у старих тварин і його фазових змін у дорослих та молодих.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **бліда поганка, протеоліз, α_1 -інгібітор протеїназ, α_2 -макроглобулін.**

ВСТУП. Отруєння дикорослими грибами залишаються актуальною проблемою токсикології протягом багатьох років. Летальні наслідки реєструють насамперед при отруєннях грибами роду Amanita. Синдром отруєння A.phalloides відмічають у 90 % смертельних випадків [1, 7]. Летальність при отруєнні блідою поганкою (БП) досягає 95 % [13].

Одним з основних напрямків сучасних наукових досліджень є вивчення системи протеолізу як особливої форми біологічної регуляції. Протеоліз постійно відбувається в живих організмах та навколишньому середовищі під впливом мікроорганізмів, у результаті чого утворюються різноманітні біологічно активні речовини – ферменти, гормони, пептиди, амінокислоти тощо [9, 17].

Протеолітичні ферменти, які мають високу біологічну активність, беруть участь у функціонуванні різних органів та систем організму і в регуляції біологічних процесів. Вони не тільки здійснюють неспецифічний розпад білкових молекул, але і контролюють функції та системи організму, що реалізується в реакціях загального та обмеженого протеолізу. За сучасними уявленнями, саме ферменти протеолізу підтримують рівновагу між загибеллю і деградацією клітин та їх відновленням [6, 14].

Зокрема, процеси обмеженого протеолізу відіграють важливу роль у функціонуванні

ренін-ангіотензинової та калікреїн-кінінової систем, імунітету, гемостазу, системи комплекменту та апоптозу [3, 4]. Біологічна активність протеолітичних ферментів визначається концентрацією ферменту і 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_1 -М, антитромбіну ІІІ, α_2 -антиплазміну, α_1 -антихімотрипсину та ін.), які утворюють комплекси з протеїназами, є однією з найбільш важливих ланок контролю за протеолізом [2, 10]. За фізіологічних умов активність протеолітичних ферментів урівноважена із рівнем інгібіторів протеїназ. При критичних станах відбувається порушення динамічної рівноваги між протеазами та їх інгібіторами, що зумовлює розвиток деструктивних і запальних змін у всьому організмі [3, 4].

Відомо, що активація процесів тканинного протеолізу є важливою ланкою в патогенезі захворювань різних органів [16, 17]. Проте патогенетичні механізми, пов'язані з активацією протеолітичних систем при отруєнні БП, практично не вивчали.

Крім того, в сучасній науковій літературі наведено багато інформації щодо механізмів токсичної дії отрути БП на живі істоти, проте практично відсутні дані про проведення системних досліджень стосовно вікових особливостей впливу токсинів БП. Саме на вплив віку

© І. П. Кузьмак, І. М. Кліщ, 2011.

на прояв токсичного ефекту вказували свого часу А. А. Голубев, Є. І. Любліна, Н. О. Толоконцев, Н. А. Філов [5]. На підставі аналізу результатів раніше проведених експериментальних досліджень було встановлено, що молоді й старі тварини більш чутливі до ряду токсичних агентів, ніж статевозрілі, дорослі особини, у зв'язку з високим рівнем обмінних процесів і утворенням більш токсичних продуктів метаболізму [8, 12].

Враховуючи вищесказане, метою даної роботи стало дослідження динаміки показників протеїназо-інгібіторної системи у тварин з гострим токсичним ураженням БП у віковому аспекті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самцях, яких утримували на стандартному раціоні віварію. В експерименті досліджували тварин трьох вікових періодів: 3-місячних (період статевого дозрівання; молоді), 6-місячних (період статевої зрілості; дорослі) та 18–24-місячних (період старості; старі) [8].

Отруєння тварин здійснювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення екстракту БП, отриманого за методом Wieland [18], в дозі 85 мг/кг маси тіла ($1/2 LD_{50}$). Евтаназію щурів проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом через 6, 24 та 72 год після отруєння з подальшим забором крові. Експерименти виконували відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2000) та узгоджених із положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [15].

Протеолітичну активність плазми крові визначали, застосовуючи азосустрати фірми "Simko" Ltd. (Україна): азоальбумін (лізис низькомолекулярних білків), азоказеїн (лізис високомолекулярних білків) і азокол (лізис колагену) [11]. Вміст α_1 -інгібітора протеїназ та α_2 -макроглобуліну визначали з використанням N-бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроаніліду (БАПНА) за методом К. М. Веремеєнка [3].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерної програми "Excel" з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені нами дослідження показали (табл. 1), що з віком інтенсивність процесів протеолізу знижується. Так, порівняно з молодими тварина-

ми, лізис азоальбуміну в дорослих становив 85,6 %, а у старих – 78,7 %. Аналогічну тенденцію ми спостерігали і стосовно азоказеїну та азоколу. На нашу думку, це може бути наслідком сповільнення з віком активності метаболічних процесів, зниження клітинного синтезу протеїнів та інтенсивності реакцій лімітованого протеолізу. Одночасно нами зафіксовано зростання з віком інгібіторного потенціалу (табл. 2), зокрема концентрація α_1 -ІП у 6-місячних тварин перевищувала аналогічний показник 3-місячних в 1,2 раза. У щурів 18–24-місячного віку цей показник зріс в 1,3 раза відносно 3-місячних. Стосовно α_2 -М ми отримали подібні результати – максимальна концентрація його спостерігалась у плазмі крові старих тварин і перевищувала відповідний показник у молодих на 37 %, а в дорослих – на 28 %.

При отруєнні тварин екстрактом БП протеїназна активність крові (ПАК) зростала в щурів усіх вікових груп, однак ступінь зростання був неоднаковим. Так, у молодих тварин максимальний лізис азоальбуміну спостерігався через 24 год після введення екстракту БП і становив 176 % порівняно з інтактними тваринами. Аналогічно у 3-місячних щурів зростали показники лізису азоказеїну й азоколу (на 94 та 92 % відповідно) порівняно з показниками групи інтактних тварин. У щурів 6-місячного віку також відбулося зростання ПАК (на 92, 77 та 81 % відповідно) з максимумом на 24 годину, однак менш виражене, ніж у молодих. Найбільш виражене зростання ПАК зафіксоване нами у старих тварин. Максимальне зростання лізису азоальбуміну (в 3,6 раза) спостерігалось через 24 год після отруєння БП порівняно з інтактними тваринами, лізис азоказеїну та азоколу зріс у 2,3 і 2,1 раза відповідно.

На наш погляд, зростання протеїназної активності за умов отруєння токсинами БП зумовлене перш за все впливом фалотоксинів, максимум дії яких спостерігався на 12–24 години від моменту отруєння. Фалотоксини, як відомо, здатні зв'язуватись із поверхнею клітин печінки, клітинними мембранами, викликаючи пошкодження мембран мітохондрій, що призводить до пригнічення реакцій окиснювального фосфорилування і зниження енергетичного потенціалу клітини, а також ендоплазматичного ретикулула, лізисом, що, у свою чергу, спричиняє загибель клітини. Збільшення концентрації 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 система комплексу. Викликані зміни зумовлюють розвиток деструктивних і запальних змін у всьому організмі. Максимальні зміни у старих тварин, на наш погляд, зумовлені вищим ступенем деградації білків і меншим ступенем контролю за системою білкових інгібіторів.

При критичних станах відбувається також порушення динамічної рівноваги між протеазами та їх інгібіторами. У наших дослідженнях значних змін зазнавала активність білкових інгібіторів плазми крові. На 6 годину експерименту нами встановлено достовірне підвищення інгібіторного потенціалу крові у молодих і дорослих тварин, в основному за рахунок збільшення вмісту α_1 -ІП, який зріс на 38 та 35 % відповідно в обох вікових групах. Щодо α_2 -М, то його концентрація теж підвищилась, але лише на 27 % у молодих і на 32 % у дорослих щурів порівняно з інтактними. Виражене збільшення вмісту α_1 -ІП у перші години після отруєння може бути зумовлене його підвищеною продукцією паралельно з гіперпродукцією інших гострофазових білків у відповідь на токсичне ураження печінки. Крім того, зростання активності основних білкових інгібіторів можна розцінювати як неспецифічну захисну реакцію організму на посиленій протеоліз та за-

пуск фізіологічних процесів адаптації у відповідь на надходження ксенобіотика в організм. У наступні терміни дослідження ми спостерігали зниження білкових інгібіторів протеїназ плазми крові. Зокрема, через 72 год від моменту отруєння концентрація α_1 -ІП у крові молодих тварин була нижчою, порівняно з інтактними, в 1,7 раза, а в дорослих – в 1,3 раза порівняно з інтактними тваринами відповідних вікових груп. Концентрація α_2 -М у молодих щурів була нижчою в 1,4 раза, а в дорослих – в 1,5 раза порівняно з інтактними.

Щодо старих щурів, то ІП крові знижувався вже на 6 годину після токсичного ураження БП, а найбільші показники зафіксовано на 72 годину за рахунок α_2 -М, концентрація якого зменшилась на 62 % порівняно з інтактними тваринами. Вміст α_1 -ІП мав аналогічну тенденцію, однак показник зниження був дещо меншим (на 53 %) відносно групи інтактних тварин.

Зниження активності інгібіторів у плазмі крові може бути результатом дії декількох факторів: по-перше, відбувається інтенсивне зв'язування ними протеїназ, що виражено активуються; по-друге, протеолітичні ферменти в активованому стані здатні еліминувати комплекси протеїназа-інгібітор з наступним розщеп-

Таблиця 1 – Вплив токсинів блідої поганки на показники протеїназ плазми крові в щурів різних вікових періодів (M±m, n=6)

Вік	Показник	Група тварин			
		інтактні	уражені блідою поганкою		
			6 год	24 год	72 год
3-місячні	Лізис азоальбуміну, E ₄₄₀ /мл/год	2,86±0,13	3,95±0,1*	7,9±0,32*	6,1±0,03*
	Лізис азоказеїну, E ₄₄₀ /мл/год	3,93±0,01	4,99±0,24*	7,62±0,18*	4,75±0,06*
	Лізис азоколу, E ₄₄₀ /мл/год	1,94±0,08	2,21±0,13	3,73±0,15*	3,16±0,04*
6-місячні	Лізис азоальбуміну, E ₄₄₀ /мл/год	2,45±0,17	3,03±0,15*	4,71±0,09*	3,58±0,15*
	Лізис азоказеїну, E ₄₄₀ /мл/год	2,13 ± 0,09	2,87±0,04*	3,76±0,17*	3,55±0,07*
	Лізис азоколу, E ₄₄₀ /мл/год	1,58 ± 0,08	1,86±0,07*	2,85±0,03*	2,33±0,06*
18-місячні	Лізис азоальбуміну, E ₄₄₀ /мл/год	2,25±0,16	6,60±0,35*	8,09±0,31*	7,43±0,41*
	Лізис азоказеїну, E ₄₄₀ /мл/год	2,93±0,25	4,19±0,37*	6,68±0,12*	4,5±0,31*
	Лізис азоколу, E ₄₄₀ /мл/год	1,12±0,12	1,48±0,07*	2,35±0,08*	1,48±0,08*

Примітка. У цій і наступній таблиці: * – вірогідні відмінності у досліджуваних показниках порівняно з тваринами контрольної групи (p<0,05).

Таблиця 2 – Динаміка концентрації інгібіторів протеолізу плазми крові в щурів з токсичним отруєнням БП (M±m, n=6)

Вік	Показник	Група тварин			
		інтактні	уражені блідою поганкою		
			6 год	24 год	72 год
3-місячні	α_1 -ІП, мкмоль/л	35,26±1,34	48,63±1,32*	31,13±0,49*	20,62±0,87*
	α_2 -М, г/л	1,92±0,05	2,43±0,16*	1,86± 0,09	1,33±0,05*
6-місячні	α_1 -ІП, мкмоль/л	41,75±1,5	56,45±2,56*	48,95±2,08*	32,9±0,77*
	α_2 -М, г/л	2,06±0,22	2,71±0,13*	2,15±0,17	1,4±0,1*
18-24-місячні	α_1 -ІП, мкмоль/л	45,17±1,56	28,57±0,99*	23,35±1,13*	21,22±0,45*
	α_2 -М, г/л	2,67±0,22	1,42±0,08*	1,22±0,12*	1,02±0,1*

ленням молекули білка; по-третє, враховуючи виражені прооксидантні властивості токсинів БП, на що вказує ряд авторів [1, 13], а також літературні дані про пошкодження вільними радикалами перш за все білкових молекул, можна вважати, що відбувається окиснення активних центрів інгібіторів (окиснювальна денатурація). Ймовірним є також зниження синтезу білків у печінці під впливом аманітинів,

що має місце за отруєння БП через 48–72 год від моменту надходження отрути.

ВИСНОВОК. Результати проведених досліджень свідчать про підсилення протеолітичної активності крові зі зниженням антипротеазного потенціалу в усі терміни дослідження у старих тварин і його фазові зміни у дорослих та молодих.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойчук Б. Р. Отруєння грибами / Б. Р. Бойчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1997. – 200 с.
2. Веремеенко К. Н. Активность цистеиновых протеиназ и их ингибиторов в раковых опухолях гортани / К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, Т. В. Семешкиева // Укр. биохим. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 159–161.
3. Веремеенко К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – К. : Здоров'я, 1988. – 200 с.
4. Веремеенко К. Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике / К. Н. Веремеенко. – К. : Здоров'я, 1971. – 216 с.
5. Количественная токсикология / А. А. Голубев, Е. И. Люблина, Н. А. Толоконцев, В. А. Филов. – Л., 1973. – 286 с.
6. Локшина Л. А. Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов / Л. А. Локшина // Биоорганич. химия. – 1994. – **206**, № 2. – С. 142–143.
7. Молдаван М. Г. Общетокическое и нейротропное действие базидиальных грибов родов *Amanita* и *Psilocybe* / М. Г. Молдаван, А. А. Гродзинская // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – № 2. – С. 15–20.
8. Савченков М. Ф. Методические вопросы исследований по возрастной токсикологии / М. Ф. Савченков // Гиг. и санит. – 1979. – № 11. – С. 58–61.
9. Самохіна Л. М. Активність протеїназ та їх інгібіторів у розвитку ушкодження нирок за умов стимульованої гіпертензії у дорослих і старих щурів / Л. М. Самохіна, В. В. Ломако, Г. О. Бабійчук // Прогресуючі нефропатії і ремоделювання серцево-судинної системи – сучасні уявлення про механізми розвитку, нове в діагностиці, лікуванні та профілактиці: матер. Всеукр. наук.-практ. конф., 17–18 квітня 2003 р., Інститут терапії АМНУ. – Харків, 2003. – С. 63–64.
10. Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения / под ред. К. Н. Веремеенко, В. Н. Коваленко. – К. : МОРИОН, 2000. – 320 с.
11. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень Буковинської державної медичної академії : методичний посібник / [В. М. Магальяс, А. О. Михеев, Ю. Е. Роговий та ін.]. – Чернівці : БДМА, 2001. – 42 с.
12. Трахтенберг І. М. Токсичність і вік: проблема стара та нова // Нариси вікової токсикології / за ред. І. М. Трахтенберга. – К. : Авіцена, 2005. – С. 10–17.
13. Черний В. И. Отравление аманитальными грибами тяжелой степени: сравнительный анализ эффективности различных видов эфферентной терапии / В. И. Черний, Р. И. Новикова, И. В. Кузнецова // Організація токсикологічної допомоги в Україні : тези доп. наук.-практ. конф. – 2002. – С. 35–36.
14. Шило О. В. Обмежений протеоліз в умовах штучного гіпометаболічного стану у хом'яків / О. В. Шило, В. В. Ломако, Л. М. Самохіна // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – № 4. – С. 114–117.
15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – P. 52.
16. Mistră U. K. Ligation of the alpha-2-macroglobulin signaling receptor on macrophages induces synthesis of platelet activating factor / U. K. Mistră, S. V. Pizzo // J. Cell. Biochem. – 1996. – **61**, № 1. – P. 39–47.
17. Proteases: Potential Role in Health and Disease / Ed. Horl W.H., Heidland A. / International symposium on Proteases. – 1982, Wursburg, Germany / Plenum Press NY. – 1984. – 591p.
18. Wieland H. Über die Giftstoffe des Knollenblatterpilzes. VI. Amanitin, das Hauptgift des Knollenblatterpilzes / H. Wieland, R. Hallermayer // Liebig's Ann. Chem. – 1941. – **548**. – S. 1–18.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОТЕИНАЗО-ИНГИБИТОРНОЙ СИСТЕМЫ В КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ПЕРИОДОВ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ БЛЕДНОЙ ПОГАНКОЙ

Резюме

Исследовано влияние токсинов бледной поганки *Amanita phalloides* на показатели протеиназо-ингибиторной системы у крыс разных возрастных периодов. В плазме крови определяли уровень протеолитической активности крови по данным лизиса азоальбумина, азоказеина, азокола; содержание белковых ингибиторов протеолиза – α_2 -макроглобулина и α_1 -ингибитора протеиназ. Установлено, что токсическое поражение бледной поганкой приводит к увеличению протеолитической активности крови на фоне угнетения ингибиторного потенциала во все сроки исследования у старых животных и его фазовых изменений у взрослых и молодых.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бледная поганка, протеолиз, α_1 -ингибитор протеиназ, α_2 -макроглобулин.

I. P. Kuzmak, I. M. Klishch

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE CHANGES OF PROTEINASE-INHIBITORY SYSTEM INDICES IN RATS OF DIFFERENT AGE IN CASE OF AMANITA PHALLOIDES INJURY

Summary

The influence of *Amanita phalloides* toxins was investigated on indices of proteinase-inhibitory system in rats of different age. The blood proteolyses activity was determined by lysing of azoalbumin, azocasein and azocol; the level of protein inhibitors of proteolysis was determined by α_2 -macroglobulin and α_1 -proteinase inhibitor levels. The toxic liver injury by *Amanita phalloides* accompanied by increasing of proteolytic activity of blood and decreasing the inhibitory potential during all terms of investigation in old rats and its phase changes in young and adult rats.

KEY WORDS: *Amanita phalloides*, proteolyses, α_1 -proteinase inhibitor, α_2 -macroglobulin.

Отримано 14.09.11

Адреса для листування: І. П. Кузьмак, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.