

УДК 616.379.-008.64-06:616.831-005.4]:616.61

М.А. Повар

## ЗМІНИ ФІБРИНО- І ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ В ПЕЧІНЦІ ТА СЕЛЕЗІНЦІ ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ, УСКЛАДНЕНИМ НЕПОВНОЮ ГЛОБАЛЬНОЮ ІШЕМІЄЮ-РЕПЕРFUЗИЄЮ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

**Резюме.** Досліджено ранні та відстрочені ефекти ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку на стан протео- та фібринолітичної активності в печінці і селезінці щурів з експериментальним цукровим діабетом. Показано, що в печінці щурів без діабету 20-хвилинна каротидна ішемія з одногодинною реперфузією не впливає на показники фібринолітичної активності, а в селезінці – знижує всі види фібринолітичної активності, а також пригнічує лізис низькомолекулярних білків в обох досліджених органах. На 12-ту добу постішемічного періоду в обох органах тварин даної експериментальної групи посилюється сумарна та не-

ферментативна активність, лізис низько-, високомолекулярних білків та колагену.

Цукровий діабет в обох органах у пізньому терміні спостереження усуває реакцію показників фібринолітичної активності, притаманну контрольним тваринам, обмежує реакцію протеолітичних систем на 12-ту добу змінами одного показника (порівняно з трьома в контрольних щурів) та спричиняє реверсію змін у ранньому постішемічному періоді.

**Ключові слова:** цукровий діабет, печінка, селезінка, ішемія мозку, протеоліз, фібриноліз.

**Вступ.** Протеолітичні системи відіграють надзвичайно важливу роль у захисті клітин від несприятливих умов, зокрема таких, як окиснювальний стрес та глікозилювання. У свою чергу, саме утворення кінцевих продуктів глікозилювання (КПГ) вважається однією з головних причин ускладнень цукрового діабету, оскільки глікозилювання структурних білків позаклітинного матриксу й сполучної тканини порушує взаємодію клітина-позаклітинний матрикс [4, 11], а глікозилювання тканин стінок судин призводить до порушення капілярного кровотоку [8, 12, 13] і звільнення активних форм кисню в результаті системної запальної відповіді [5, 6, 9]. Крім того, моноцити й ендотеліальні клітини можуть взаємодіяти з КПГ через їх рецептори, що посилює секрецію цитокінів і медіаторів запалення цими клітинами [6, 11]. Зростання продукції просклеротичних цитокінів та розбалансування системи протеази/антипротеази, посилює фіброз екстрацелюлярного матриксу [4, 11]. Глікозилювані білки резистентні до протеаз, що вкупі з порушенням за умов діабету протеасомної активності сприяє накопиченню модифікованих білкових агрегатів [7, 9, 10].

Порушення в системі протеази-антипротеази, а також зміни фібринолітичної активності виникають і при ішемічно-реперфузійних пошкодженнях, однак дослідження стану протео- та фібринолітичних параметрів у печінці та селезінці при ускладненні цукрового діабету ішемією-реперфузією головного мозку досі не проводилися.

**Мета дослідження.** Вивчити ранні та відстрочені ефекти двобічної каротидної ішемії на показники протео- та фібринолітичної активності в печінці і селезінці щурів зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом.

**Матеріал і методи.** Моделювання ЦД здійснювали шляхом однократного внутрішньочеревного уведення двомісячним білим нелінійним лабораторним самцям щурів стрептозотоцину (Sigma, США, 60 мг на 1 кг маси тіла) [3]. Через чотири місяці формували групи щурів без діабету і з його наявністю, яким здійснювали двобічне кліпсування загальних сонних артерій [1] протягом 20 хв із наступною реперфузією тривалістю 1 год та 12 діб. Рівень глікемії визначали глюкозооксидазним методом. Усі дослідження у тварин із ЦД проводили за умови наявності в них рівня глікемії вище 10 ммоль/л. У гомогенатах печінки та селезінки визначали показники тканинної фібрино- та протеолітичної активності [2] за допомогою реактивів Simko Ltd, Україна.

Тварин виводили з експерименту декапітацією під наркозом (каліпсол, 70 мг/кг маси тіла).

Результати досліджень опрацьовано за допомогою пакета прикладних програм “Statistica (“Statsoft”, США). За тестом Шапіро-Уїлка групи порівняння мали нормальний розподіл. Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних виборок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Результати вивчення лізису низько-, високомолекулярних білків та колагену в печінці і селезінці представлені в таблицях 1, 2. В обох досліджених органах щурів без ЦД 20-хвилинна ішемія з одногодинною реперфузією призвела до достовірного зниження лізису азоальбуміну на 4 і 6 % у печінці і селезінці відповідно. На 12-ту добу спостереження виявлено зростання стосовно контролю лізису низько-, високомолекулярних білків та колагену на 13, 23, 32 % у печінці та на 14, 10, 16 % – у селезінці. Стосовно раннього терміну

**Таблиця 1**  
**Показники тканинного протеолізу в печінці щурів при поєднаній дії цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку (M±m, n=11)**

Група спостереження	Лізис низько-молекулярних білків (мкг азоальбуміну /г тканини за год)	Лізис високо-молекулярних білків (мкг азоказеїну/г тканини за год)	Лізис колагену (мкг азоколу/г тканини за год)
Контроль	23,253±0,274	19,106±0,359	6,042±0,452
Ішемія-реперфузія головного мозку (20 хв/1 год)	22,516±0,237 p <sub>1</sub> <0,03	19,651±0,803	6,029±0,504
Ішемія-реперфузія головного мозку (12 діб)	26,251±0,306 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	23,415±0,286 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	7,998±0,421 p <sub>1</sub> <0,051 p <sub>2</sub> <0,01
Цукровий діабет	22,599±0,136 p <sub>1</sub> <0,05	18,072±0,253 p <sub>1</sub> <0,05	6,585±0,394
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (20 хв/1 год)	23,783±0,400 p <sub>3</sub> <0,05	18,133±0,784	7,041±0,401
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (12 діб)	21,847±0,396	19,021±0,425	7,189±0,242

Примітка. Тут та в наступних таблицях – вірогідність змін порівняно з показниками: p<sub>1</sub> – у контрольних тварин; p<sub>2</sub> – у щурів із короткотривалою ішемією-реперфузією; p<sub>3</sub> – у щурів із цукровим діабетом; p<sub>4</sub> – у щурів із цукровим діабетом та короткотривалою ішемією-реперфузією

**Таблиця 2**  
**Показники тканинного протеолізу в селезінці при поєднаній дії цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку (M±m, n=11)**

Група спостереження	Лізис низько-молекулярних білків (мкг азоальбуміну /г тканини за год)	Лізис високо-молекулярних білків (мкг азоказеїну/г тканини за год)	Лізис колагену (мкг азоколу/г тканини за год)
Контроль	19,350±0,222	18,733±0,348	6,109±0,156
Ішемія-реперфузія головного мозку (20 хв/1 год)	18,264±0,217 p <sub>1</sub> <0,005	18,059±0,25	5,684±0,204
Ішемія-реперфузія головного мозку (12 діб)	22,148±0,262 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	20,612±0,245 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	7,090±0,402 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,01
Цукровий діабет	21,415±0,308 p <sub>1</sub> <0,001	21,584±0,208 p <sub>1</sub> <0,001	7,119±0,219 p <sub>1</sub> <0,004
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (20 хв/1 год)	21,449±0,201	20,275±0,298 p <sub>3</sub> <0,001	6,690±0,112
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (12 діб)	20,842±0,297	19,723±0,305 p <sub>3</sub> <0,001	7,085±0,197

спостереження зазначені показники зросли на 16, 19, 33 % у печінці та на 21, 14, 25 % – у селезінці. Отже, до 12-ї доби спостереження зміни активності протеолітичних ферментів у внутрішніх органах, спричинені ішемією-реперфузією головного мозку, продовжуються, що свідчить про довготривалі ефекти даного втручання.

Цукровий діабет до четвертого місяця розвитку мав органоспецифічний вплив на стан протеолітичної активності: у печінці за даної експериментальної моделі достовірно знизився лізис низько- і високомолекулярних білків на 3 і 6 % відповідно, а в селезінці виявлено зростання лізису низько-, високомолекулярних білків і колагену на 11, 15, 17 % відповідно. У печінці щурів із ЦД після завершення 20-хвилинної ішемії-

одногодинної реперфузії виявлено достовірне зростання на 5 % лізису азоальбуміну, а в селезінці – зниження на 7 % лізису азоказеїну, що свідчить про модифікуючий вплив ЦД на реагування даних показників на ішемію-реперфузію головного мозку. Характерно, що в печінці мала місце реверсія змін того ж показника, що й у контрольних тварин, а в селезінці змін зазнав показник, який у тварин контрольної групи за цих умов залишався незмінним. На 12-ту добу постішемічного періоду в щурів із ЦД, на відміну від тварин без даного страждання, зміни протеолітичної активності виявилися суттєво обмеженими: у печінці вони проявилися зниженням лише лізису низькомолекулярних білків (на 8 %), а в селезінці – зниженням лізису високомолекулярних білків

Таблиця 3

**Вплив ішемії-реперфузії головного мозку на показники тканинного фібринолізу в печінці самців-щурів за умов цукрового діабету (M±m, n=11)**

Група спостереження	Сумарна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)	Неферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)	Ферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)
Контроль	8,021±0,607	4,050±0,532	3,971±0,333
Ішемія-реперфузія головного мозку (20 хв/ 1 год)	7,520±0,563	3,839±0,376	3,682±0,333
Ішемія-реперфузія головного мозку(12 діб)	11,328±0,321 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	7,058±0,426 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	4,270±0,278 p <sub>2</sub> <0,001
Цукровий діабет	8,308±0,647	4,112±0,509	4,196±0,315
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (20 хв/1 год)	8,353±0,784	4,341±0,613	4,012±0,636
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (12 діб)	9,856±0,356	5,047±0,429	4,809±0,268

Таблиця 4

**Вплив ішемії-реперфузії на показники тканинного фібринолізу в селезінці самців-щурів за умов цукрового діабету (M±m, n=11)**

Група спостереження	Сумарна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)	Неферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)	Ферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за год)
Контроль	8,893±0,184	4,436±0,105	4,457±0,123
Ішемія-реперфузія головного мозку(20 хв/ 1 год)	7,551±0,162 p <sub>1</sub> <0,001	3,758±0,073 p <sub>1</sub> <0,001	3,793±0,129 p <sub>1</sub> <0,001
Ішемія-реперфузія головного мозку(12 діб)	11,767±0,278 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	6,973±0,401 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	4,794±0,233 p <sub>2</sub> <0,001
Цукровий діабет	10,786±0,302 p <sub>1</sub> <0,001	5,487±0,157 p <sub>1</sub> <0,001	5,300±0,157 p <sub>1</sub> <0,001
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (20 хв/1 год)	9,635±0,177 p <sub>3</sub> <0,002	4,900±0,110 p <sub>3</sub> <0,003	4,735±0,078 p <sub>3</sub> <0,002
Діабет та ішемія-реперфузія головного мозку (12 діб)	10,856±0,356 p <sub>4</sub> <0,003	5,868±0,330 p <sub>4</sub> <0,006	4,988±0,259

(на 9 %) . Отже, ЦД модифікує як ранню, так і відстрочену реакцію протеолітичної активності на ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку.

Показники стану тканинної фібринолітичної активності у тварин різних експериментальних груп представлено в таблицях 3, 4. Після 20-хвилинної ішемії з одноденною реперфузією в печінці щурів без ЦД нами не виявлено змін вивчених параметрів фібринолізу, разом із тим у селезінці встановлено зниження сумарної (СФА), неферментативної (НФА) та ферментативної (ФФА) фібринолітичної активності на 5, 15 % та 15 % відповідно. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду стосовно відповідних показників у тварин контрольної групи відбулося зростання сумарної та неферментативної ФА на 41 та 74 % у печінці, 32 % та 57 % – у селезінці.

Дані показники з часом продовжували зростати, про що свідчить їх достовірні зміни стосовно таких у ранньому періоді спостереження. Зростання становило 51 % та 84 % для СФА і НФА в печінці, 56, 85 % та 26 % – у селезінці для СФА, НФА та ФФА. Таким чином, як і у випадку протеолітичної активності, до 12-ї доби спостереження порушені ішемією-реперфузією головного мозку показники фібринолітичної активності не нормалізуються.

Ще суттєвіша органоспецифічність впливу ішемії-реперфузії на стан тканинного фібринолізу виявлена в щурів із ЦД – якщо в печінці в обидва терміни спостереження досліджені показники не відреагували на ушкодження головного мозку (за винятком достовірного зростання на 19 % СФА на 12-ту добу), то в селезінці в ранньому терміні спостереження їх реакція за спрямуван-

ням нагадувала таку у тварин без ЦД, тобто, мало місце зниження СФА, НФА та ФФА на 11 % для всіх показників. На 12-ту добу спостереження показники поверталися до рівня, зафіксованого в щурів із ЦД. Стосовно показників за раннього терміну відбулося зростання СФА та НФА на 13 і 20 %.

Таким чином, ЦД модифікує реакцію тканинних протео- та фібринолітичних систем печінки і селезінки на ішемічно-реперфузійне ушкодження головного мозку в обидва терміни спостереження, однак для пізнього ішемічно-реперфузійного періоду характерною ознакою є відсутність або суттєве обмеження даної реакції за кількістю вивчених показників.

### Висновки

1. У печінці щурів без діабету 20-хвилинна каротидна ішемія з одноденною реперфузією не впливає на показники фібринолітичної активності, а в селезінці – знижує всі види фібринолітичної активності, а також пригнічує лізис низькомолекулярних білків в обох досліджених органах. На 12-ту добу постішемічного періоду в обох органах тварин без діабету посилюється сумарна та неферментативна активність, лізис низько-, високомолекулярних білків та колагену.

2. Цукровий діабет в обох органах у пізньому терміні спостереження усуває реакцію показників фібринолітичної активності, притаманну контрольним тваринам, обмежує реакцію протеолітичних систем на 12-ту добу змінами одного показника (порівняно з трьома в контрольних щурів) та спричиняє реверсію змін у ранньому постішемічному періоді.

### Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати свідчать про доцільність вивчення в зазначених органах вмісту продуктів окиснювальної модифікації білків.

### Література

1. Скибо Г.Н. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов

ишемического поражения мозга / Г.Н. Скибо // Патология. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 22-30.

2. Сучасні методи експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / В.М. Магальяс, А.О. Міхєєв, Ю.С. Роговий [та ін.]. – Чернівці, 2001. – 42 с.
3. Ткачук О.В. Участь антигенпрезентуючих клітин в реакції тимуса на ішемію-реперфузію головного мозку в щурів зі стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом / О.В. Ткачук // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2010. – № 2 (13). – С. 87-90.
4. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications / R. Nagai, D.B. Murray, T.O. Metz // Diabetes. – 2012. – Vol. 61, № 3. – P. 549-559.
5. Giacco F. Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee // Circ. Res. – 2010. – Vol. 107, № 9. – P. 1058-1070.
6. Goldberg R.B. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications / R.B. Goldberg // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 94, № 9. – P. 3171-3182.
7. Hyperglycemia Impairs Proteasome Function by Methylglyoxal / M.A. Queisser, D.Yao, S. Geisler [et al.] // Diabetes. – 2010. – Vol. 59, № 3. – P. 670-678.
8. Mechanism of diabetic macroangiopathy / Nishio Y. // Nihon Rinsho. – 2006. – Vol. 64, № 11. – P. 1991-1997.
9. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus / S. de M. Bandeira, L.J.S. da Fonseca, G. da S. Guedes [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14, № 2. – P. 3265-3284.
10. Proteomic Analysis of Protease Resistant Proteins in the Diabetic Rat Kidney / B.B. Sneha, D.C. Ashok, S.J. Rakesh [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 228-236.
11. Ramasamy R. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications / R. Ramasamy, S.F. Yan, A.M. Schmidt // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2011. – Vol. 1243. – P. 88-102.
12. Sasaki S. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Vascular Complications / S. Sasaki, T. Inoguchi // Diabetes Metab. J. – 2012. – Vol. 36, № 4. – P. 255-261.
13. Son S.M. Reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of vascular complications of diabetes / S.M. Son // Diabetes Metab. J. – 2012. – Vol. 36, № 3. – P. 190-198.

## ИЗМЕНЕНИЯ ФИБРИНО- И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ-РЕПЕРFUЗИЕЙ МОЗГА

М.А. Повар

**Резюме.** Исследованы ранние и отсроченные эффекты ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга на состояние протео- и фибринолитической активности в печени и селезенке крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Показано, что в печени крыс без диабета 20-минутная каротидная ишемия с односторонней реперфузией не влияет на показатели фибринолитической активности, а в селезенке – снижает все виды фибринолитической активности, а также подавляет лизис низкомолекулярных белков в обоих исследованных органах. На 12-ые сутки постішемического периода в обоих органах животных данной экспериментальной группы усиливается суммарная и неферментативная активность, лизис низко-, высокомолекулярных белков и коллагена. Сахарный диабет в обоих органах в позднем сроке наблюдения устраняет реакцию показателей фибринолитической активности, присущую контрольным животным, ограничивает реакцию протеолитических систем на 12-е сутки изменениями одного показателя (по сравнению с тремя у контрольных крыс) и вызывает реверсию изменений в раннем постішемическом периоде.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, печень, селезенка, ишемия мозга, протеолиз, фибринолиз.

**CHANGES IN FIBRIN AND PROTEOLYTIC ACTIVITY IN THE LIVER AND SPLEEN OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES, COMPLICATED BY INCOMPLETE GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION**

*M.A. Povar*

**Abstract.** We have studied some early and delayed consequences of ischemic reperfusion lesions of the brain for the state of proteo and fibrinolytic activity in the liver and spleen of rats with experimental diabetes. It is shown that in the liver of rats without diabetes 20-minute carotid ischemia with one- hour reperfusion does not affect the performance of fibrinolytic activity, and in the spleen it reduces all kinds of fibrinolytic activity and inhibits lysis of low molecular proteins in both studied organs. On the 12th day of the postischemic period in both organs of animals of the experimental group the total non-enzymatic activity, lysis of low-, high-molecular proteins and collagen increase.

Diabetes in both organs in the late period of observation eliminates the reaction of the performance of fibrinolytic activity, typical for the control animals, limits the proteolytic reaction on the 12<sup>th</sup> day with one index changes (compared to three in the control rats) and causes a reversion of changes in early postischemic period.

**Key words:** diabetes mellitus, liver, spleen, cerebral ischemia, proteolysis, fibrinolysis.

Higher State Educational Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University» (Chernivtsi)

Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 1 (77). – P. 120-124

Надійшла до редакції 28.12.2015 року