

## ПОКАЗНИКИ ПРОТЕЇНАЗО-ІНГІБІТОРНОЇ СИСТЕМИ В БРОНХАХ МОРСЬКИХ СВИНОК У ПІЗНЬОМУ ПЕРІОДІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

**М.А. Колішецька**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького  
Кафедра патологічної фізіології (зав. - проф. М.С. Регада)

### Реферат

**Мета.** Вивчення стану протеїназо-інгібіторної системи в бронхах морських свинок у пізній період формування експериментальної моделі БА.

**Матеріал і методи.** Експериментальні дослідження проводились на 60 морських свинках (самці) масою 180-220 г, поділених на 5 груп по 12 тварин у кожній. До I групи (контроль) відносили інтактні морські свинки, до II - тварини з експериментальною БА (5-а доба), до III - морські свинки на 19-4 добу експерименту, до IV - тварини з експериментальною БА (26-а доба), до V - мурчаки на 33-ю добу БА. З метою більш детального аналізу показників ПІС умовно виділяли два періоди розвитку експериментальної бронхіальної астми: ранній і пізній. Ранній період включав групу тварин із БА на 5-у та 19-у доби експерименту. Пізній - морські свинки на 26-у та 33-ю доби БА. Стан протеолітичної активності в бронхах вивчали за сумарною активністю тканинних протеїназ - інтенсивністю лізису низькомолекулярних білків (азоальбуміну), високомолекулярних білків (азоказеїну) та колагену (лізис азоколу). Рівень інгібіторів протеолізу - за вмістом альфа-1-інгібітора протеїназ ( $\alpha 1$ -ІІІ), альфа-2-макроглобуліну ( $\alpha 2$ -М) за методом Веремеєнко К.Н., Голобородько О.П., 1988. Статистичне опрацювання одержаних даних здійснювали за методом Стьюдента.

**Результати й обговорення.** Результати біохімічних досліджень свідчать, що у тварин за умов розвитку експериментальної бронхіальної астми наявні характерні ознаки дисбалансу протеїназо-інгібіторної системи. Так, на 26-у добу розвитку цієї патології виявлено підвищення вмісту азоальбуміну на 69,7% ( $p < 0,05$ ) проти групи тварин контролю. Пізніше, на 33-ю добу БА спостерігалось ще суттєвіше зростання його рівня в бронхах на 107,2% ( $p < 0,05$ ) проти I групи мурчаків. Щодо наступного показника - азоказеїну, то в IV та V груп тварин при даному експерименті підвищується його рівень в бронхах відповідно на 98,5% ( $p < 0,05$ ) і на 133,8% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. Важливим маркером, який доповнює характеристику інших, є азоколаген. Пізній період формування БА супроводжувався його зростанням проти інтактної групи на 107,7% ( $p < 0,05$ ) на 26-у добу експерименту і цей показник залишався стабільно високим на 138,5% ( $p < 0,05$ ) вище від контрольної групи тварин на 33-ю добу БА, що вказує на пришвидшення процесів протеолізу. Визначення активності  $\alpha 2$ -макроглобуліну в бронхах у пізній період формування БА виявило поступове зниження його на 45,1% ( $p < 0,05$ ) на 26-у і на 64,6% ( $p < 0,05$ ) на 33-ю доби експерименту в порівнянні з першою групою морських свинок. Дослідження  $\alpha 1$ -ІІІ дало можливість виявити аналогічний напрямок змін. Так, на 26-у і 33-ю доби

цієї експериментальної моделі хвороби встановлено зниження його активності відповідно на 55,5% ( $p < 0,05$ ) та на 75,5% ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контролем.

**Висновки.** Таким чином, визначення окремих компонентів протеїназо-інгібіторної системи в бронхах в динаміці розвитку БА дозволило виявити надмірне утворення продуктів протеолізу на тлі виснаження компенсаторних механізмів інгібіторної системи, особливо у пізній період, а саме на 33-ю добу експериментальної БА, що свідчить про суттєве порушення функціонального стану протеїназо-інгібіторної системи.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, азоальбумін, азоказеїн, азоколаген,  $\alpha 1$ -інгібітор протеаз,  $\alpha 2$ -макроглобулін

### Abstract

#### INDICATORS OF PROTEINASE INHIBITORY SYSTEM IN THE BRONCHI OF GUINEA PIGS IN THE LATE PERIOD OF EXPERIMENTAL ASTHMA

M.A. KOLISHETSKA

The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

**Aim.** Study the state of proteinase inhibitory system in the bronchi of guinea pigs in the late period of formation of experimental bronchial asthma (BA).

**Materials and Methods.** Experimental studies were conducted on guinea pigs, divided into five groups: I - control group; group II - guinea pigs at day 5 of experiment; group III - guinea pigs at day 19 of bronchial asthma development; group IV - day 26 of experiment; and group V - day 33 of asthma process. Early period included groups of animals on the day 5 and day 19 of experiment. The late period included guinea pigs on day 26 and day 33 of bronchial asthma. Experimental bronchial asthma was simulated by the method of V.I. Babych (1979). Condition of proteinase inhibitory system in the bronchi was determined by lysis of the azoalbumin, azocasein and azocollagen and maintenance content of  $\alpha 1$ -protease inhibitor ( $\alpha 1$ -PI),  $\alpha 2$ -macroglobulin by method of K.N. Veremeenko and O.P. Goloborodko (1988).

**Results and Discussion.** Results of biochemical studies suggest that the animals with induced experimental asthma symptoms show features of imbalances of the proteinase inhibitory system. Thus, on the 26<sup>th</sup> day of this pathology an increased content of azoalbumin by 69,7% ( $p < 0,05$ ) compared with the control group of animals was revealed. Later, on the 33<sup>rd</sup> day of asthma an even more significant increase in its levels in the bronchi to 107,2% ( $p < 0,05$ ) compared with I group was revealed. The level of another indicator - azocasein in the bronchi raises in groups IV and

*V* in this experiment, respectively, by 98,5% ( $p < 0,05$ ) and by 133,8% ( $p < 0,05$ ) compared with the control group. An important marker that complements the other characteristics is azocollagen. The late period of asthma formation was accompanied by its growth compared to the intact group by 107,7% ( $p < 0,05$ ) after 26 days of the experiment, and this figure remained higher by 138,5% ( $p < 0,05$ ) compared to the control group of animals on the 33<sup>rd</sup> day of asthma, which points to acceleration of the proteolysis processes. Determination of  $\alpha 2$ -macroglobulin activity in the bronchi in the late period of asthma formation showed its gradual decrease by 45,1% ( $p < 0,05$ ) on day 26 and by 64,6% ( $p < 0,05$ ) on day 33 of the experiment compared with the first group of guinea pigs. The study of the  $\alpha 1$ -PI made it possible to identify a similar trend of the changes. Thus, on day 26 and day 33 of the experimental course of the disease a reduction of its activity compared to the control group by 55,5% ( $p < 0,05$ ) and by 75,5% ( $p < 0,05$ ), respectively, was determined.

**Conclusions.** Determining the individual components of the proteinase inhibitory system in the bronchi in the course of BA development revealed excessive formation of products of proteolysis against a background of exhaustion of compensatory mechanisms of the inhibitory system, especially in the later period, namely, on day 33 of the experimental asthma, indicating substantial disturbance of the functional state of the proteinase inhibitory system.

**Key words:** asthma, azoalbumin, azocasein, azocollagen,  $\alpha 1$ -protease inhibitor,  $\alpha 2$ -macroglobulin

## Вступ

Бронхіальна астма (БА) - хронічне запальне захворювання дихальних шляхів, у патогенезі якого бере участь велика кількість клітин і клітинних елементів, асоційоване з гіперреактивністю дихальних шляхів, призводить до повторних епізодів свистячого дихання, задишки, відчуття стиснення в грудях, кашлю, особливо у нічні та ранкові години [2, 3]. У літературі ведеться активна дискусія щодо патогенезу, діагностики та лікування цього захворювання [3]. Однак усі патогенетичні механізми, що зумовлюють прогресування БА, досі залишаються не вивчені [1, 4]. Істотну роль у механізмі розвитку бронхіальної астми відіграє протеїназо-інгібіторна система (ПІС). В останні роки особливу увагу привертають глікопротеїди плазми крові, яким притаманна здатність зв'язувати протеолітичні ферменти, котрі відіграють ключову роль в обміні речовин. Із дією ферментів протеолізу пов'язані різноманітні функції організму - гемостаз, фібриноліз, кініногенез, утворення активних форм білків, пептидів, імунні реакції, обмін сполучної тканини та ін. [5, 6]. Окрім того, протеїнази бе-

руть участь у запальних і алергічних реакціях, онкогенній трансформації, розвитку вірусних інфекцій, в тому числі і ВІЛ [4, 6]. Здатність протеолітичних ферментів розщеплювати білкові структури тканин і крові вимагає найтоншого їх активності. Найважливіший механізм регулювання активності протеїназ здійснюється за допомогою тканинних і сироваткових білків-інгібіторів, які можна розглядати як одну із захисних систем організму [7].

Мета дослідження - вивчення стану протеїназо-інгібіторної системи в бронхах морських свинок у пізній період формування експериментальної моделі БА.

## Матеріал і методи

Експериментальні дослідження проводились на 60 морських свинках (самці) масою 180 - 220 г, поділених на 5 груп по 12 тварин у кожній. До I групи (контроль) відносили інтактні морські свинки, до II - тварини з експериментальною БА (5-а доба), до III - морські свинки на 19-у добу експерименту, до IV - тварини з експериментальною БА (26-а доба), до V - мурчаки на 33-ю добу БА. Із метою більш детального аналізу показників ПІС умовно виділяли два періоди розвитку експериментальної бронхіальної астми: ранній і пізній. Ранній період включав групу тварин із БА на 5-у та 19-у доби експерименту. Пізній - морські свинки на 26-у та 33-ю доби БА.

Експериментальна модель БА відтворювалась на морських свинках за методом В.І. Бабича (1979). Усіх експериментальних тварин утримували в стандартних умовах віварію Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького. Евтаназію тварин проводили шляхом декапітації з дотриманням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985). Стан протеолітичної активності в бронхах вивчали за сумарною активністю тканинних протеїназ - інтенсивністю лізису низькомолекулярних білків (азоальбуміну), високомолекулярних білків (азоказеїну) та колагену (лізис азоколу). Рівень інгібіторів протеолізу - за вмістом альфа-1-інгібітора протеїназ ( $\alpha 1$ -ІІІ), альфа-2-макроглобуліну ( $\alpha 2$ -М) за методом Веремеєнко К.Н., Голобородько О.П., 1988 [8]. Варіаційно-

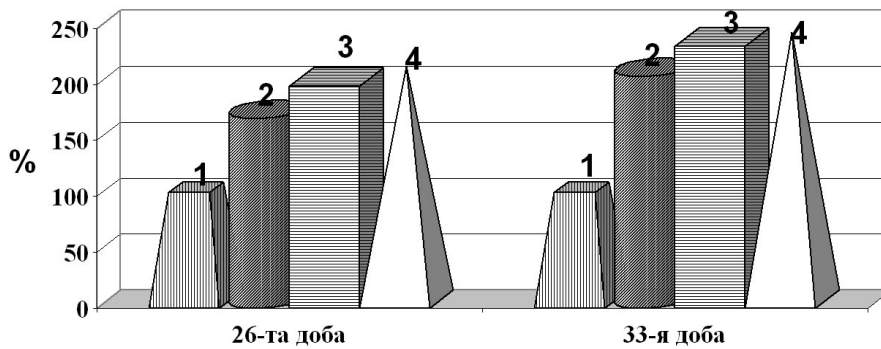


Рис. 1

Динаміка протеолітичної активності в бронхах морських свинок у пізній період БА (% від контролю).

1 - контроль, 2 - азоальбумін, 3 - азоказеїн, 4 - азоколаген

статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Вірогідність змін встановлювали за t-критерієм Стьюдента.

### Результати й обговорення

Результати біохімічних досліджень свідчать, що у тварин за умов розвитку експериментальної бронхіальної астми наявні характерні ознаки дисбалансу протеїназо-інгібіторної системи. Це проявляється в значній інтенсивності лізису протеїнів з надмірним пригніченням у бронхах інгібіторів протеаз. Так, на 26-у добу розвитку цієї патології виявлено підвищення вмісту азоальбуміну на 69,7% ( $p < 0,05$ ) проти групи тварин контролю. Пізніше, на 33-ю добу БА спостерігалось ще суттєвіше зростання його рівня в бронхах на 107,2% ( $p < 0,05$ ) проти I групи мурчаків, що свідчить про стимуляцію процесів протеолізу, особливо в пізній період цієї експериментальної моделі хвороби (рис. 1).

Важливим доповненням для більш глибокої та всебічної характеристики стану протеаз є визначення у бронхах тварин при БА наступного показника - азоказеїну. Результати досліджень показали подібний характер і однонаправленість. Так, в четвертій та п'ятій групі тварин при цьому експерименті підвищується рівень азоказеїну в бронхах відповідно на 98,5% ( $p < 0,05$ ) і на 133,8% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем (рис. 1).

Важливим маркером, який доповнює характеристику інших, є азоколаген. Пізній період формування БА супроводжувався його зростанням проти інтактної групи на 107,7% ( $p < 0,05$ ) на 26-у добу експерименту і цей показник залишався стабільно високим на 138,5% ( $p < 0,05$ ) вище від

контрольної групи тварин на 33-ю добу БА, що вказує на пришвидшення процесів протеолізу.

Отже, одержані дані показників протеїназ в бронхах свідчать про те, що рівень зазначених маркерів поетапно підвищувався і набув свого апогею в найпізніші терміни спостереження (33-я доба). У свою чергу, така надмірна протеолітична активність при експериментальній БА зумовлює зрушення системи інгібіторного захисту. Визначення активності  $\alpha 2$ -макроглобуліну в бронхах у пізній період формування БА виявило поступове зниження його на 45,1% ( $p < 0,05$ ) на 26-у і на 64,6% ( $p < 0,05$ ) на 33-ю доби експерименту в порівнянні з першою групою морських свинок (рис. 2).

Дослідження іншого показника, який характеризує стан інгібіторної системи -  $\alpha 1$ -ІІІ, дало можливість виявити аналогічний напрямок змін, подібних до  $\alpha 2$ -М за умов розвитку БА. Так, на 26-у і 33-ю доби цієї експериментальної моделі хвороби встановлено зниження його активності відповідно на 55,5% ( $p < 0,05$ ) та на 75,5% ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контролем, що вказує на виснаження інгібіторного потенціалу захисту в бронхах за умов розвитку БА (рис. 2).

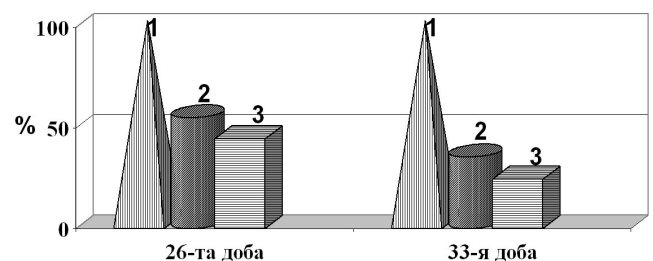


Рис. 2

Активність інгібіторів протеаз у бронхах морських свинок в динаміці пізнього періоду БА (% від контролю).

1 - контроль, 2 -  $\alpha 2$ -М, 3 -  $\alpha 1$ -ІІІ



## Висновки

Таким чином, проведений комплекс біохімічних досліджень показників протеїназо-інгібіторної системи показав виражені зміни в пізньому періоді БА з перевагою механізмів пошкодження. Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновки, що з прогресуванням захворювання, зростанням ступеня тяжкості підвищується активність протеїназ і з'являється дисбаланс між протеїназним потенціалом і активністю інгібіторів розпаду білків. Так, встановлено значне зростання продуктів протеолізу в бронхах у пізній період формування бронхіальної астми, особливо виражене на 33-ю добу експерименту. Динаміка активності інгібіторної системи характеризується зниженням рівня всіх досліджуваних показників, як на 26-у, так і на 33-ю доби експериментальної БА. Таким чином, визначення окремих компонентів протеїназо-інгібіторної системи в бронхах в динаміці розвитку БА дозволило виявити надмірне утворення продуктів протеолізу на тлі виснаження компенсаторних механізмів інгібіторної системи, особливо у пізній період, а саме на 33-ю добу експериментальної БА, що свідчить про суттєве порушення функціонального стану протеїназо-інгібіторної системи.

## Література

1. Aganche I., Akdis C., Jutel M. et al. Untangling asthma phenotypes and endotypes // *Allergy*. - 2012. - V. 67, Is. 7. - P. 835-846.
2. Cherbac V.V., Kubyshkin A.V. Effect of application unhybytorov proteynazy antioxidant inflammation in Formation at eksperymentalnoy pneumonia. *General Pathology and Pathological Physiology*. - 2011. - Т.6. - № 3: 57-63. Ukrainian (Щербак В.В., Кубышкин А.В. Влияние применения ингибиторов протеиназы антиоксидантов на формирование воспаления при экспериментальной пневмонии. *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. - 2011. - Т.6. - № 3: 57-63).
3. Global strategy for asthma management and prevention (GINA 2011) [http://www.ginasthma.org/pdf/GINA\\_Report\\_2011.pdf](http://www.ginasthma.org/pdf/GINA_Report_2011.pdf).
4. Hesselmar B., Enelund A.-C., Eriksson B. et al. The heterogeneity of asthma phenotypes in children and young adults // *J Allergy*. - 2012. - Article ID 163089. - P. 6.
5. Kit B.K., Simon A.E., Ogden C.L. et al. Trends in preventive asthma medication use among children and adolescents, 1988-2008 // *Pediatrics* - 2012. - № 129. - P. 62-70.
6. Regeda M.S., Regeda M.M., Furdychko L.O., Kolishetska M.A. *Bronchial asthma 2012, Vol.5, Lviv, 147p.* Ukrainian (Бронхіальна астма. / М.С.Регада, М.М. Регада, Л.О. Фурдичко, М.А. Колішецька. Вид. п'яте, доп. та переробл. - Львів 2012. - 147с.).
7. Umanec T.R. Clinic-anamnestic features of phenotypes of bronchial asthma for children. *Perinatology and paediatrics* 2011; № 2(46): 69-71. Ukrainian (Уманець Т.Р. Клініко-анамнестичні особливості фенотипів бронхіальної астми у дітей. *Перинатологія и педиатрия* 2011; № 2(46):69-71).
8. Veremeenko K.N., Goloborodko, A.Y. *Kyzym Proteolysis in norm and at pathology. K. : Health, 1988. - 200p.* Ukrainian (Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., А.И.Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. К.: Здоров'я, 1988. - 200с.).