

УДК 616.24 – 76.29.49: 76.03.31

Т. Ю. Лихолат, О. А. Лихолат

Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара

СТАН ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ, АЛІМЕНТАРНО ЕКСПОЗОВАНИХ ЕСТРОГЕНАМИ

Інгібіція протеолітичних процесів в організмі дослідних щурів за впливу аліментарних стероїдних гормонів може призводити до гальмування апоптозу внаслідок порушення сигнальних шляхів передачі інформації та напруження в системі детоксикації з наступним розвитком проліферативних гіперпластичних процесів і раку в естрогенозалежних тканинах і, зокрема, молочній залозі.

Ключові слова: протеолітичні процеси; стероїдні гормони; апоптоз; проліферація

ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) в структурі захворюваності та смертності жіночого населення стійко займає лідируючі позиції. У структурі онкологічної захворюваності жінок в Україні РМЗ посідає перше місце. Рівень захворюваності на РМЗ в Україні за останні 45 років (1965-2010) зріс з 17,6 до 69,7 на 100 тис. жіночого населення, за останні 20 років – у 2,5 рази, щорічний приріст цієї онкопатології становить більше 2 %. За даними Національного канцер-реєстру щорічно в Україні реєструють понад 16,5 тис. нових випадків РМЗ, серед яких 25 % – жінки репродуктивного віку [6].

Харчування становить 30-35 % факторів ризику, які спричиняють виникнення пухлин. У сучасному промисловому тваринництві при інтенсивних технологіях вирощування тварин з порушенням технологічних регламентів часто незаконно застосовуються шкідливі для здоров'я людини гормональні стимулятори росту і тиреостатики, тому що вони дозволяють домогтися значного підвищення продуктивності. Є вагомі підстави вважати, що споживання великої кількості жирів тваринного походження (з м'ясом і молочними продуктами) може викликати розвиток РМЗ. Статеві гормони тварин ідентичні гормонам людини. Потрапляючи в організм людини з їжею, ці гормони сприймаються ним як свої власні. Надмірний рівень естрогену в організмі буває причиною захворювань різного ступеня тяжкості: у жінок (особливо літнього віку) він здатен викликати рак грудей [5].

Найбільш відповідальний період постнатально-го онтогенезу – статеве дозрівання (пубертатний період). Статеві гормони разом з іншими факторами чинять виражений ефект на біохімічні обмінні проце-

си, впливають на функцію різних органів і систем організму: при гіпоестрогенії (що не відповідає віку) розвиваються остеопороз, гормональна кардіопатія, депресивний стан, сенільні психози; при гіперестрогенії – гіперпластичні процеси і гормонозалежні пухлини [5].

Протеолітичні ензими залучені до ключових про-онкогенних процесів: ангиогенезу, інвазії та метастазування. Посилення експресії протеаз та їх активності спостерігається в злоякісних пухлинах людини і корелює зі злоякісною прогресією та несприятливим прогнозом для пацієнта [15].

Мета роботи – дослідження протеолітичних процесів в органах щурів різного віку, що піддавалися впливу екзоестрогенів, для визначення тригерних механізмів розвитку новоутворень.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти були проведені на щурах-самках лінії Вістар, які піддавалися впливу екзоестрогену протягом 45 діб. На початок експерименту вік піддослідних тварин складав 3 місяці – у препубертатному періоді (група II) та 6 місяців – статевозрілі (група IV). Контрольні групи – інтактні тварини відповідного віку (групи I та III).

Для моделювання впливу екзогенного естрогену їжу щурів обробляли препаратом «Сінестрон» – похідним стильбену, який за хімічною будовою відрізняється від стероїдних естрогенних гормонів, але за біологічними і лікувальними властивостями близький до них — в розрахунку 2 мкг на кг маси.

Матеріали дослідження: мозок і печінка щурів. Об'єкт досліджень: показники активності протеолізу: трипсину та його облігатних інгібіторів – α 1-антитрипсину (α 1-АТ), α 2-макроглобуліну (α 2-МГ) [2], катепсину В і катепсину L [1], вмісту молекул середньої маси (МСМ) [4], загального білка [12].

© Лихолат Т. Ю., Лихолат О. А., 2014

Таблиця

ЗСУВИ В ПРОТЕОЛІТИЧНІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ, ПІДДАНІ ВПЛИВУ АЛІМЕНТАРНИХ ЕСТРОГЕНІВ (M±m)

Показник	I група, n=6	II група, n=6	III група, n=6	IV група, n=6
Печінка				
Трипсин, нмоль/с г білка	0,65±0,03	0,73±0,04*	0,67±0,033	0,72±0,036*
α1-АТ, мкмоль/с г білка	0,46±0,02	0,54±0,03*	0,48±0,024	0,53±0,027*
α2-МГ, мкмоль/с г білка	23,5±1,17	21,62±1,08	24,11±1,20	25,2±1,26
Катепсин L, ум.од./г білка	21,19±1,06	18,01±0,91	20,78±1,04	18,65±0,93
Катепсин В, ум.од./г білка	20,88±1,04	21,06±1,05	21,07±1,05	21,34±1,05
МСМ, ум.од.	8,78±0,44	10,15±0,52	7,68±0,38	8,78±0,44
Мозок				
Трипсин, нмоль/с г білка	0,073±0,004	0,061±0,003*	0,072±0,003	0,067±0,003*
α1-АТ, мкмоль/с г білка	0,27±0,01	0,29±0,01	0,26±0,01	0,24±0,01
α2-МГ, мкмоль/с г білка	13,77±0,69	22,41±1,12*	14,42±0,63	14,27±0,71
Катепсин L, ум.од./г білка	12,74±0,61	13,66±0,68	11,05±0,55	14,43±0,72
Катепсин В, ум.од./г білка	14,07±0,73	15,47±0,77	14,25±0,70	13,11±0,66
МСМ, ум.од.	4,67±0,23	3,94±0,19*	4,15±0,22	4,67±0,23*

Примітка: * – вірогідність змін у порівнянні з контрольними показниками, $p \leq 0,05$.

Одержані дані обробляли стандартними методами оцінки варіаційних рядів. Різницю між порівнюваними величинами вважали вірогідною при $p < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Існують дані, що в пухлинних процесах важливу роль відіграє протеоліз: сприяє підвищенню проліферативної активності, інгібуванню апоптозу, стимуляції неоангіогенезу та індукції лікарської резистентності. Велику роль в інвазії та метастазуванні злоякісних пухлин відіграють цистеїнові пептидогідролази – катепсини [14].

Після проведення досліджень із визначення впливу екзоестрогену на протеолітичні процеси самиць препубертантного та статевозрілого віку були отримані наступні результати.

Доведено, що трипсин є неспецифічним переносником стероїдних гормонів. У печінці спостерігалось зниження індексу трипсину у піддослідній II групі щурів (на 16 %), у той час як у статевозрілих самиць активність ензиму підвищена на 13% в IV групі (табл.).

α1-Антитрипсин – глікопротеїн, який синтезується в печінці. Показано, що α1-АТ інгібує хімотрипсин-індукуємії апоптоз печінкових клітин, що призводить до неконтрольної проліферації пухлинних клітин [7]. Рівень α1-АТ був вищим у II групі на 17 % у порівнянні з інтактною і домінував у IV групі (на 11 %).

α2-Макроглобулін є глікопротеїном, інгібітором плазматичних протеїназ і використовується в якості маркера проникності клітинних мембран. В силу позитивного впливу естрогенів на синтез α2-МГ концентрація його у жінок приблизно на 20% більша, ніж у чоловіків; α-МГ має властивість зв'язувати гормони та цитокіни (IL, IFN, TNF-α, фактори зростання) [11]. Активність α2-МГ мала тенденцію до зниження у піддослідних щурів препубертантного віку і слабко зростала у піддослідних статевозрілих особин.

Цистеїнові катепсини є важливими регуляторами та сигнальними молекулами великої кількості біологічних процесів. Підвищена активність катепсинів була продемонстрована в багатьох пухлинних клітинах [9]. Активність катепсину В є позитивним регулятором апоптотичного каскаду [8]. Катепсин В сприяє проліферації епітеліальних клітин молочної залози і передраковому прогресуванню раку, естроген впливає на його активність [13]. Катепсин L в основному відповідає за виділення факторів зростання пухлини [16]. Катепсини В та L, які, крім деструктивної, виконують і регуляторну функцію, здійснюючи постсинтетичну модифікацію попередників пептидних гормонів та нейромедіаторів [10].

Активність цистеїнового катепсину L була знижена у печінці самиць препубертантного віку при порівнянні з контрольною на 15 % і на 12 % статевозрілих особин IV групи.

При визначенні активності трипсину в мозку були отримані наступні дані: в контрольній групі I активність ензиму домінувала над показником відповідної піддослідної групи на 14,2 %. В контрольній групі статевозрілих особин активність трипсину була вищою на 5 % у порівнянні з показником самиць піддослідної групи. Спостерігалася тенденція до підвищення ферментативної активності α1-АТ у піддослідних групах препубертантних та статевозрілих самиць на 7,6 % та 6,85 %, відповідно. При дослідженні активності α2-МГ детермінована активація на 62,8 % у піддослідній групі II при порівнянні з контрольною I, в той час як відхилення показника між дослідними групами статевозрілих тварин були незначними.

За експозиції препарату Сінестрон у мозку щурів у препубертантному періоді зафіксована активація катепсину В на 10 % при порівнянні з контрольною групою аналогічного віку. У статевозрілих са-

миць активність ферменту знижена на 6,2 % в піддослідній групі в порівнянні з контролем.

Нервові клітини містять великі кількості катепсину L. Визначена функція катепсину L в секреторних везикулах в якості ключової протеази для протеолітичного процесингу пронейропептидів і прогормонів в активні нейропептиди, які є посередниками для синапсів у міжклітинних комунікаціях у нервовій системі. За експозиції препарату Сінестрол у мозку щурів обох піддослідних відбувалася активація катепсину L: на 7,2 % (II група) та 13,25 % (IV група).

Одним з провідних патогенетичних синдромів критичних станів є ендogenous інтоксикація, яку детермінують за вмістом молекул середньої маси. Показане їх накопичення в органах щурів обох піддослідних груп. Так, зростання вмісту МСМ у самиць препубертатного віку, що споживали Сінестрон, складо у печінці 12 %, у нирках – 32,5 %, у сироватці крові – 18,5 %, у головному мозку – 15,6 %. У статевозрілих самиць підвищення становило 7,4 %, 11,3 %, 14 % та 14 %, відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Аліментарна експозиція щурів екзоестрогенами призводить до змін в протеолітичній системі та розвитку ендogenous інтоксикації, що є органоспецифічними та залежними від віку тварин: вищий рівень посилення активності інгібіторної ланки та вмісту МСМ спостерігається у щурів у пубертатному періоді, що спричиняє зниження потенціалу захисних механізмів організму і може стати тригером дисфункції систем природної детоксикації та біотрансформації, порушення сигнальних шляхів передачі інформації. Визначені феномени в організмі дослідних щурів можуть призводити до гальмування апоптозу – одного з основних механізмів видалення ушкоджених клітин з популяції.
2. Стероїдні гормони, що надходять до організму з харчовими продуктами, здатні ініціювати ендокринні порушення, моделювати реакції, що залежать від рецепторів стероїдних гормонів, в патологічні, які результують в несприятливі проблеми зі здоров'ям для людей, а саме зростання ризику розвитку пухлин і метастазів. Припустимо, що перераховані вище ефекти обумовлюють розвиток проліферативних гіперпластичних процесів і раку в естрогенозалежних тканинах і, зокрема, молочній залозі.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Березин В. А. Очистка и некоторые свойства тиоактивируемого катепсина из больших полушарий головного мозга и мозжечка быка / В. А. Березин, В. И. Черная, А. Д. Рева, О. В. Смагина // Укр. биохим. журн. – 1982. – № 3. – С. 249-253.
2. Карягина И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, $\alpha 1$ -антитрипсина и $\alpha 2$ -макрогло-

булина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Карягина, З. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лаб. дело. – 1990. – № 2. – С. 10-13.

3. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М., 1990. – 293 с.
4. Малахова М. Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации / М. Л. Малахова // Эффер. терапия. – 1995. – № 1. – С. 60-65.
5. Уварова Е. В. Репродуктивное здоровье девочек подросткового возраста / Е. В. Уварова // Рос. вестник перинат. и педиатрии. – 2003. – Т. 48, № 5. – С. 8-9.
6. Федоренко З. П. Рак в Україні 2011-2012 / [З. П. Федоренко, Ю. Й. Михайлович, Л. О. Гулак та ін.] // Бюл. Нац. канцер-реєстру України. – 2013. – № 14. – 120 с.
7. Emoto T. Alpha 1-antichymotrypsin inhibits chymotrypsin-induced apoptosis in rat hepatoma cells / [T. Emoto, K. Nakamura, Y. Y. Nagasaka et al.] // Apoptosis. – 1998. – Vol. 3, № 3. – P. 155-160.
8. Eykelbosh A. J. A role for the lysosomal protease cathepsin B in zebrafish follicular apoptosis / A. J. Eykelbosh, K. G. Van Der // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2010. – Vol. 156, № 2. – P. 218-223.
9. Fröhlich E. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma / [E. Fröhlich, B. Schlagenhauff, M. Möhrle et al.] // Cancer. – 2001. – Vol. 91, № 5. – P. 972-982.
10. Hook V. Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease / [V. Hook, L. Funkestein, J. Wegrzyn et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1. – P. 89-104.
11. Lauer D. Alpha 2-macroglobulin-mediated degradation of amyloid beta 1-42: a mechanism to enhance amyloid beta catabolism / D. Lauer, A. Reichenbach, G. Birkenmeier // Exp. Neurol. – 2001. – Vol. 167. – P. 385-392.
12. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / [O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-269.
13. Mullins S. R. Three-dimensional cultures modeling premalignant progression of human breast epithelial cells: role of cysteine cathepsins / [S. R. Mullins, M. Sameni, G. Blum et al.] // Biol. Chem. – 2012. – Vol. 17. – P. 11-15.
14. Palermo C. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer / C. Palermo, J. A. Joyce // Trends Pharmacol. Sci. – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 22-28.
15. Pandey A. Cancer testes antigens in breast cancer: biological role, regulation, and therapeutic applicability / [A. Pandey, A. Kurup, A. Shrivastava et al.] // Int. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 5. – P. 302-320.
16. Rochefort H. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? / [H. Rochefort, F. Capony, M. Garcia et al.] // J. Cell. Biochem. – 1987. – Vol. 1. – P. 17-29.

УДК 616.24 – 76.29.49: 76.03.31**Т. Ю. Лихолат, О. А. Лихолат****СОСТОЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА КРЫС, АЛИМЕНТАРНО
ЭКСПОЗИРОВАННЫХ ЭСТРОГЕНАМИ**

Ингибирование протеолитических процессов в организме подопытных крыс при воздействии алиментарных стероидных гормонов может приводить к торможению апоптоза вследствие нарушения сигнальных путей передачи информации и напряжения в системе детоксикации с последующим развитием пролиферативных гиперпластических процессов и рака в эстроген-зависимых тканях и, в частности, молочной железе.

Ключевые слова: протеолитические процессы; стероидные гормоны; апоптоз; пролиферация

UDC 616.24 – 76.29.49: 76.03.31**T. Yu. Lykholat, O. A. Lykholat****STATE OF PROTEOLYTIC SYSTEM IN THE RAT ORGANISM BY ALIMENTARY ESTROGENS EXPOSED**

Inhibition of the proteolytic processes in the experimental rats' organism under the influence of the nutritional steroid hormones can lead to apoptosis deceleration due to the violations of signaling pathways of data transmission and tension in the system of detoxification followed by the development of the proliferative hyperplastic processes and cancer in estrogen-sensitive tissues and in the particular breast.

Key words: proteolytic processes; steroid hormones; apoptosis; proliferation

Адреса для листування:
49010, м. Дніпропетровськ, вул. Казакова, 24.
Тел. 0502291962. E-mail: Lykholat2006@ukr.net
Дніпропетровський національний університет
ім. О. Гончара

Надійшла до редакції:
27.02.2014 р.