

*И. С. КОЛЬБАЙ, У. Н. КАПЫШЕВА, Ш. К. БАХТИЯРОВА,
М. Н. АХМЕТОВА, А. БАИМБЕТОВА, А. И. БАЙДАЛИНОВ, Б. А. ДЖУСИПБЕКОВА*

УРОВЕНЬ ОБЩЕЙ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНЕЙ У КРЫС ПРИ НЕВРОТИЗАЦИИ И ДЕЙСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

(Представлена академиком НАН РК К. Т. Ташеновым)

Известно, что нарушение баланса между образованием кислородных радикалов при экстремальных воздействиях и уровнем природных антиоксидантов низкомолекулярной или ферментной природы играет главную роль в повреждениях, которые являются причиной многих заболеваний [1–3]. Эти соединения – супероксидный, гидроксильный радикалы, а также молекулярная перекись водорода – играют важную роль в живых системах, так как легко взаимодействуют с биологическими соединениями, модифицируют их и тем самым изменяют протекание физиологических процессов. Они называются «активные формы кислорода». Имеются данные, связанные с повреждением и деградацией белка

кислородными радикалами [4, 5], что приводит к снижению антиоксидантного потенциала клеток и тканей, а свободнорадикальное окисление можно рассматривать как возможную причину функциональных изменений мембраносвязанных ферментов [6, 7].

Окисленные белки функционально неактивны, и их развертывание связано с повышенной чувствительностью к протеазам. Тем не менее при определенных условиях, когда меняется скорость образования модифицированных белков и протеолитические ферменты клеток не справляются с их утилизацией, это может способствовать наблюдаемому накоплению и повреждающему действию окисленных белков при старении и при патологиях, таких,

как диабет, атеросклероз и нейродегенеративные заболевания [8].

При разработке профилактических мер и терапии невротических заболеваний обязательно учитываются индивидуальные отличия в устойчивости к патогенному воздействию эмоционального стресса. Показано, что проявление невротических симптомов на начальных этапах развития картины невроза исходит из индивидуальных особенностей личности или животного [9].

Типологические особенности высшей нервной деятельности (ВНД) как человека, так и животного оказывают прямое влияние на их устойчивость к стрессу. Активация различных зон мозга, вызванная эмоциональным стрессом, быстро иррадирует на внутренние органы и системы, вызывая в первую очередь нарушения вегетативных реакций. Устойчивость определенных вегетативных параметров в динамике нарушений у животных с сильным типом ВНД сочетается со значимыми нарушениями деятельности этих же параметров в группе животных слабого типа ВНД. При этом отмечалось, что сама по себе стабильность вегетативных параметров не является абсолютным признаком отсутствия вегетативных реакций и изменений в конфликтных стрессорных ситуациях. Согласованная реакция на стресс, выраженная через изменение значений вегетативных показателей, свидетельствует о процессе адаптации данных животных к воздействию, вызывающему целостную интегрированную реакцию [10].

При изучении механизмов развития неврозов в последнее время большое внимание уделяется роли циркуляторной гипоксии головного мозга в этом процессе [11] и коррекции выявленных нарушений ВНД с помощью биологически активных веществ, обладающих антигипоксическим и антиоксидантным действием [12,13]. Поэтому важным представлялось изучение возможности применения новых лечебно-профилактических средств из местного растительного сырья, содержащего биологически активные вещества с выраженными антиоксидантными свойствами. Одним из таких препаратов является биосластилин (БС), представляющий собой вытяжку из корня солодки, обогащенную до 70–80% основным компонентом – глицирризиновой кислотой. Ранее он использовался нами для коррекции сдвигов, вызываемых токсическим несимметричным диметилгидразином на состояние клеточных мембран у крыс [14].

С учетом отсутствия сведений об изменении уровня протеолитической активности тканей у крыс с различными индивидуально-типологическими особенностями поведения (ИТОП) при стрессовых воздействиях, включающих эмоциональный компонент, а также в целях коррекции выявленных сдвигов с помощью биологически активных препаратов и были запланированы настоящие исследования, включающие использование биосластилина, а также известных антиоксидантов – витаминов С и Е.

Материалы и методы

В экспериментах использовано 158 взрослых лабораторных белых крыс обоего пола массой 200–290 г, 35 из которых служили контролем.

Проведены три серии экспериментов, в которых у крыс в тестах «открытое поле» (ОП) [15] и «эмоциональный резонанс» (ЭР) [16] определяли индивидуально-типологические особенности поведения (ИТОП). Крысы первой серии служили контролем. Во второй серии опытов животных подвергли 21-дневной невротизации без предварительной дачи биологически активных препаратов. В третьей, четвертой и пятой сериях животным на протяжении трех недель до невротизации *reg os* давали соответственно биосластилин (БС, 0,25 мг на крысу), витамин С (0,25 мг на крысу) и витамин Е (1,5 МЕ на крысу).

21-дневная невротизация включала совместное, взаимно усиливающее воздействие астенизирующих и невротизирующих факторов, направленных на истощение компенсаторных реакций организма крыс. Невротизацию мы проводили по ранее разработанному методу [17] с некоторыми модификациями [18]. Время невротизации составляло 4–5 ч ежедневного воздействия в течение 10 дней.

У контрольных крыс и животных, подвергнутых невротизации, в острых опытах под нембуталовым наркозом (4 мг/100 г массы тела, внутримышечно) канюлировали наружную сонную артерию для взятия проб крови. Для предотвращения свертывания крови в качестве антикоагулянта вводили гепарин (500 МЕ/кг внутривенно). После вскрытия брюшной полости по белой линии живота в отпрепарированный кишечный лимфатический сосуд также вставляли канюлю для сбора лимфы. После этого брали кровь для анализа, а затем сосудистую систему животных промывали охлажденным до 6 °С физиологическим раствором и брали брыжечные лимфатические узлы, кусочки печени и стенки тонкой кишки, которые гомогенизировали

на холоду с помощью гомогенизатора типа «Ultra Turrax T8».

После центрифугирования крови в течение 10 мин при 1000g эритроциты дважды промывали средой инкубации, содержащей 150 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4). Уровень общей протеолитической активности (ОПА) кишечной лимфы, плазмы крови, эритроцитов, а также гомогенатов лимфоузлов, печени и стенки тонкой кишки определяли по разработанной нами методике с использованием для осаждения белков этилового спирта [19]. Калибровочную кривую строили с применением аминокислоты глицина, и полученные данные выражали в мкг глицина (Гли) на 1 мл (для эритроцитов) или на 1 г ткани (для гомогенатов) на 1 ч инкубации. Контроль – протеолитическая активность проб без инкубации.

Результаты статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel, и изменения параметров с учетом непарного критерия Фишера–Стьюдента считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В проведенных экспериментах на основании анализа данных, полученных в тестах ОП и ЭР, крысы были разделены по типам ВНД на: 1) особей с сильным типом ВНД, показавших признаки высокой лабильности мозговых процессов в ситуации ОП и ЭР; 2) слабый тип ВНД – животные со слабо выраженными признаками адаптации к меняющейся среде в тестах ОП и ЭР; 3) животные с промежуточным типом ВНД, показавшие в обоих тестах промежуточное поведение, и особи, не вошедшие в другие группы. Следует отметить, что в данной группе имеются особи с проявлением ярко выраженного «сочувствия» к крысе-«жертве» и активной двигательной реакцией, но в ситуации теста ЭР они не смогли быстро принять решение и покинуть затемненный отсек.

У крыс контрольной группы было выявлено, что уровень общей протеолитической активности эритроцитов и плазмы крови был большим у крыс сильного типа ($67,92 \pm 4,10$ и $53,88 \pm 3,44$ мкгГли/мл·ч соответственно), снижаясь до $67,53 \pm 4,04$ и $53,71 \pm 3,63$ мкгГли/мл·ч соответственно у животных промежуточного типа, а минимальным – у крыс слабого типа ($60,22 \pm 3,94$ и $50,71 \pm 3,22$ мкгГли/мл·ч соответственно). Такая же закономерность была характерна и для уровня общей протеолитической активности

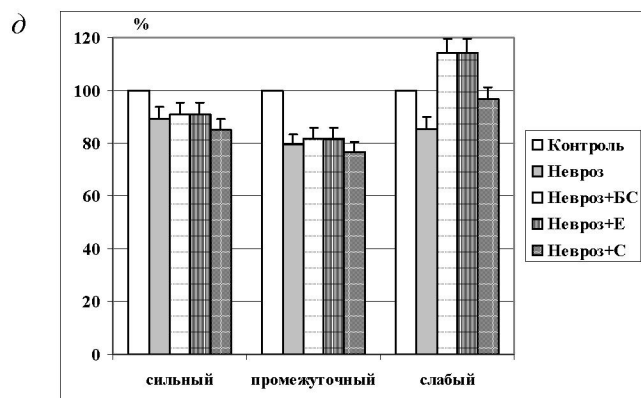
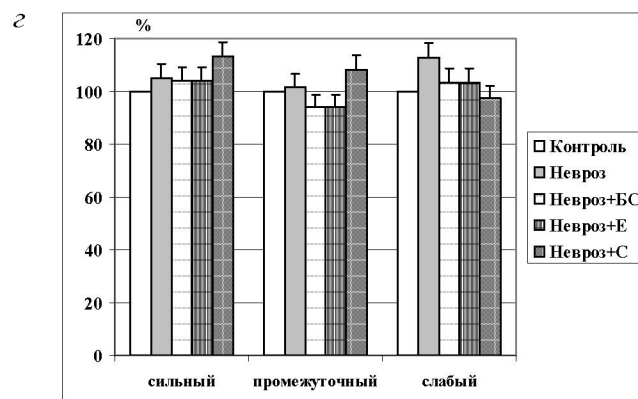
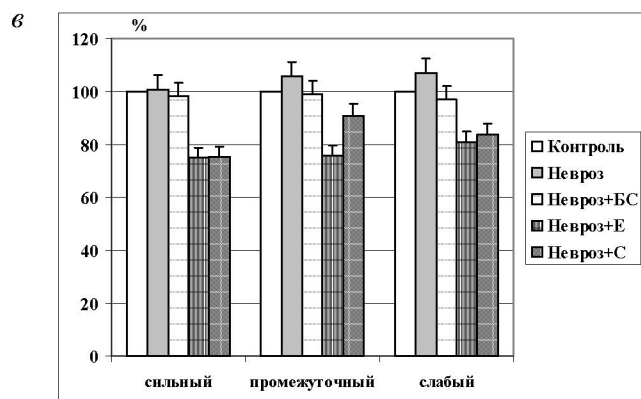
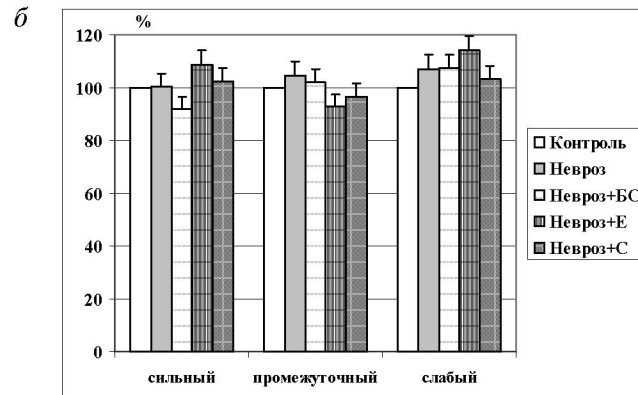
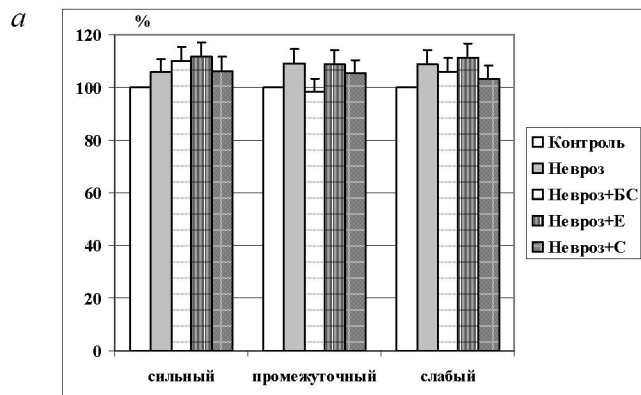
гомогенатов печени, лимфатических узлов и стенки кишки: он был наибольшим у крыс сильного типа ($1719,71 \pm 86,32$, $225,15 \pm 10,14$ и $3684,16 \pm 154,42$ мкгГли/г·ч соответственно), снижаясь до $1658,05 \pm 84,22$, $214,02 \pm 9,94$ и $3520,19 \pm 139,69$ мкгГли/г·ч соответственно у животных промежуточного типа, а минимальным – у крыс слабого типа ($1622,04 \pm 90,19$, $205,40 \pm 11,41$ и $3061,40 \pm 151,02$ мкгГли/г·ч соответственно).

Проведение 21-дневной невротизации приводило к повышению уровня общей протеолитической активности эритроцитов и плазмы крови у крыс, причем более выраженные сдвиги отмечались в основном у животных слабого типа, что отражено на рисунке а, б. Так, у крыс сильного, промежуточного и слабого типов при действии невротизации уровень активности протеаз эритроцитов повышался на 5,6, 9,2% ($p < 0,05$) и 8,8% ($p < 0,05$) соответственно, а плазмы крови – на 0,3, 4,7, 7,3% ($p < 0,05$) соответственно. Дача животным биологически активных веществ – биосластилина, витаминов Е и С приводила в основном к меньшим по выраженности сдвигам общей протеолитической активности эритроцитов и плазмы крови у крыс всех трех типов (см. рисунок, а, б).

21-дневная невротизация приводила к повышению уровня общей протеолитической активности гомогенатов печени и лимфоузлов, но к снижению этого показателя в гомогенатах стенки кишки у крыс, причем более выраженные сдвиги отмечались в основном у животных слабого типа, что отражено на рисунке, в–д. Так, у крыс сильного, промежуточного и слабого типов при действии невротизирующего стрессирования уровень активности протеаз гомогенатов печени повышался на 1,0, 5,8 7,0% ($p < 0,05$) соответственно, лимфоузлов – на 5,0, 1,6, 12,9% ($p < 0,05$) соответственно, а стенки кишки – снижался на 10,7% ($p < 0,05$), 20,5% ($p < 0,01$) и 14,5% ($p < 0,05$) соответственно.

Дача животным всех типов биологически активных биосластилина, витаминов Е или С приводила в основном к тому, что невротизация оказывала менее выраженное влияние на активность протеолитических ферментов исследованных тканей. При этом направленность сдвигов при действии биосластилина, аскорбиновой кислоты или б-токоферола в разных тканях могла различаться, что отражено на рисунке, в–д.

Переходя к обсуждению полученных результатов, следует отметить, что сохранение гомеостаза



Изменение уровня общей протеолитической активности эритроцитов (а), плазмы крови (б), гомогенатов печени (в), гомогенатов лимфоузлов (г), гомогенатов стенки кишечника (д) у крыс при невротизирующем стрессировании и даче биологически активных веществ. BC – биосластилин, E – витамин E, C – витамин C

при действии факторов внешней и внутренней среды обусловлено реализацией многих неспецифических реакций, одинаковых как для всех органов и тканей, так и для всех уровней адаптации, – изменением количества активно функционирующих структур, интенсификацией обновления и образования структур, а также адаптивной перестройкой ферментных систем, путей метаболизма и др. [20].

Известно, что очищение организма от денатурированных белков осуществляется во многих органах и системах, характеризующихся различным уровнем активности протеолитических ферментов и их ингибиторов [21, 22]. Установлено, что практически все исследованные нами ткани – эритроциты,

плазма крови, печень, кишка и лимфоузлы вносят вклад в катаболизм протеинов, причем наибольшее количество протеолитических ферментов, как и следовало ожидать, содержится в кишечной стенке, основное назначение которой – участие в переваривании белков пищи. Процесс деградации белков, конформация которых изменена, играет важную роль в поддержании гомеостаза и колебаний концентрации белка в клетках млекопитающих. Этот процесс может регулироваться как внутренними свойствами белковых субстратов, так и факторами, взаимодействуя с белками, «помечают» протеины, нуждающиеся в деградации, или же катаболизирующим аппаратом клетки [23].

В контрольных опытах нами было установлено, что уровень общей протеолитической активности, отражающий состояние биологических мембран, в определенной мере связан с ИТОП животных. Так, у крыс сильного типа отмечались более высокие уровни общей протеолитической активности исследованных тканей.

В экспериментах показаны разнонаправленные изменения уровня общей протеолитической активности различных тканей у крыс при невротизации: снижение – в гомогенатах кишки, повышение – в эритроцитах, плазме крови, гомогенатах лимфоузлов и печени. При этом выраженность изменения активности протеаз тканей была связана с ИТОП животных: большие сдвиги отмечались у крыс слабого типа. С учетом основной функции кишечника по перевариванию поступивших в организм белков уменьшение уровня общей протеолитической активности в кишке, по-видимому, в первую очередь определяется прямым негативным влиянием стрессирования на активность пищеварительных ферментов кишечника.

Зарегистрированное нами повышение уровня протеолитической активности эритроцитов, плазмы крови, гомогенатов лимфатических узлов и печени при невротизации, по-видимому, и является свидетельством активации защитных сил организма, направленных на снижение содержания в организме конформационно измененных белков и пептидных фрагментов, обладающих токсическим действием, количество которых возрастает при действии сильного стрессирующего фактора.

Как показали исследования, использование биологически активных веществ, таких, как биосластин, витамины Е и С, обладающие антиоксидантным действием, приводит к снижению негативного эффекта длительной невротизации на состояние клеточных мембран, что проявилось в меньших по выраженности сдвигах уровня общей протеолитической активности всех исследованных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sies H.* Oxidative stress: from basic research to clinical application // *Am. J. Med.* 1991. V. 91, N 3C. P. 31S-38S.
2. *Durackova Z., Bergendi L., Liptakova A., Muchova J.* Free radicals derived from oxygen, and medicine // *Bratisl. Lek. Listy.* 1993. V. 94, N 8. P. 419-434.
3. *Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Оситов А.Н., Роцупкин Д.И.* Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1991. Т. 29. 252 с.

4. *Hunt J.V., Simpson J.A., Dean R.T.* Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins // *Biochem. J.* 1988. V. 250, N 1. P. 87-93.
5. *Davies K.J.* Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis // *J. Free Radic. Biol. Med.* 1986. V. 2, N 3. P. 155-173.
6. *Binkova B., Erin A.N., Sram R.J., Topinka J.* Lipid peroxidation-induced changes in physical properties of annular lipids in rat brain synaptosomal membranes // *Gen. Physiol. Biophys.* 1990. V. 9, N 3. P. 311-318.
7. *Davies K.J., Fu S., Dean R.T.* Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals // *Biochem. J.* 1995. V. 305, N Pt 2. P. 643-649.
8. *Dean R.T., Fu S., Stoker R., Davies M.J.* Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation // *Biochem. J.* 1997. V. 324, N Pt 1. P. 1-18.
9. *Айрапетянц М.Г., Вейн А.М.* Неврозы в эксперименте и в клинике. М.: Наука, 1982. 272 с.
10. *Мехедова А.Я., Фролов М.В.* Закономерности перехода от нормы к неврозу у собак с различными типологическими особенностями в пищевой и оборонительной ситуациях // *ЖВНД.* 1990. Т. 40, вып. 3. С. 543-549.
11. *Айрапетянц М.Г.* Участие церебральной гипоксии в патогенезе неврозов (новая концепция) // *ЖВНД.* 1997. Т. 47, вып. 2. С. 412-419.
12. *Айрапетянц М.Г., Левшина И.П., Шуйкин Н.Н.* Коррекция проявлений неврозоподобного состояния белых крыс с помощью витаминного комплекса аекол // *ЖВНД.* 2000. Т. 50, вып. 2. С. 274-280.
13. *Гуляева Н.В., Левшина И.П.* Теоретическое и экспериментальное обоснование применения витамина Е в комплексе с димексидом в профилактике и терапии неврозов // *Экспериментальные неврозы и их фармакологическая терапия.* М.: Наука, 1988. С. 15.
14. *Джуситбекова Б.А., Кольбай И.С., Алинбаева Ж.М.* и др. Уровень общей протеолитической активности различных тканей крыс при действии гептила, ионов кадмия и биосластилина in vitro // *Изв. МОН РК, НАН РК. Серия биол. и мед.* 2003. № 3. С. 68-73.
15. *Hall C.S.* Original methods // *J. Comp. Psychol.* 1934. V. 18. P. 385.
16. *Симонов П.В.* Условные реакции эмоционального резонанса у крыс // *Нейрофизиологический подход к анализу внутривидового поведения.* М., 1976. С. 6.
17. *Заркешев Э.Г., Плещов О.И.* Методика получения экспериментальных неврозов у морских свинок и крыс // *Изв. АН КазССР. Сер. биол.* 1989. № 5. С. 88-90.
18. *Капышева У.Н.* Сравнительная характеристика методов невротизации крыс // *Вестн. КазНУ. Сер. биол.* 2004. № 2(23). С. 102-104.
19. *Kolbay I.S., Seitkulova L.M.* Level of total proteolytic activity in rat intestinal lymph, lymph nodes, and lymphocytes // *Acta medica et biologica (Japan).* 2002. V. 50, N 3. P. 151-156.
20. *Beynon R.J., Bond J.S.* Catabolism of intracellular protein: molecular aspects // *Am. J. Physiol.* 1986. V. 251, N 2. Pt 1. P. C141-C152.
21. *Aksentsev S.L., Samoilenko S.G., Kaler G.V., Konev S.V.* Effect of proteolysis on the state of lipid phase in rat brain synaptosomal membranes // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 316, N 1. P. 47-51.
22. *Локишина Л.А.* Протеиназы плазматической мембраны лимфоидных клеток и их биологические функции // *Биоорг. хим.*

1998. Т. 24, № 5. С. 323-331.

23. *Neurath H.* Proteolytic processing and regulation // *Enzyme*.
1991. V. 45, N 5-6. P. 239-243.

Резюме

Жүргізілген тәжірибелерде эритроциттер мен плазманың және ішек, бауыр мен лимфа түйіндердің жалпы протеолиттік белсенділігінің деңгейі егеуқұйрықтардың жоғары нерв әрекетінің жеке түрлі ерекшеліктерімен байланысты: жануарларда күшті түрі жоғарылау болады. 21 күндік невротизациялау ішектің жалпы протеолиттік белсенділігінің деңгейін төмендетеді, ал басқа тіндерде – көтереді. Жануарларға невротизациямен бірге биологиялық белсенді биосластин және E мен C дәрумендер берілген кезінде протеазалардың белсенділігінің кемуі байқалған.

Summary

In experiments on rats it was shown that the level of the total proteolytic activity of blood erythrocytes and plasma, homogenates of the intestine, liver and lymph nodes depended on the individual-type peculiarities of the higher nervous activity: it was higher in animals of the strong type. The 21-days neurotization decreased the level of intestinal total proteolytical activity, but increased one of other tissues. The administration per os of bioslastilin, vitamins E and C during the neurotization led to significantly less shifts in the tissues proteases activity.

*Институт физиологии человека
и животных ЦБИ МОН РК*

Поступила 10.01.06г.