

УДК 612.014.4:612.143+612.42

И. С. КОЛБАЙ, М. Н. АХМЕТОВА, У. Н. КАПЫШЕВА, Ш. К. БАХТИЯРОВА,
Б. Х. АБИШЕВ, Б. А. ДЖУСИПБЕКОВА, А. БАИМБЕТОВА, А. Т. ОРАЗОВА

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗ КРОВИ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМИ ИНДИВИДУАЛЬНО-ТИПОЛОГИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ВНД ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОТРЕБЛЕНИИ ЭТАНОЛА И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

(Институт физиологии человека и животных МОН РК)

В экспериментах на крысах показано, что окислительный стресс, вызываемый алкоголизацией, приводит к повышению уровня токсичности крови за счет увеличения содержания среднемолекулярных пептидов. При этом этанол подавляет активность протеаз эритроцитов и плазмы, призванных очищать организм от конформационно измененных белков и их токсичных фрагментов. Использование же биосластилина, обладающего антиоксидантными свойствами, но не пропротена-100, приводит к снижению негативного влияния этанола на состояние клеточных мембран.

Проблема злоупотребления алкоголем – социальное бедствие для всей мировой общности. При хроническом самоотравлении алкоголем развиваются хронические заболевания всех систем и органов организма с поражением центральной и периферической нервной, иммунной и половой систем [1–3]. Наиболее исследован клеточный механизм развития алкоголизма на уровне биохимических процессов в отдельных клетках. Так, показано, что длительное употребление алкоголя приводит к развитию окислительного стресса в организме, сопровождаемому повышением уровня липидной пероксидации, снижением активности антиоксидантных ферментов и уровня неферментных антиоксидантов в тканях, а также увеличенными уровнями маркеров липидной и белковой модификации [4,5].

При этом алкоголизм в клиническом и биологическом смысле представляет собой гетерогенное по своей природе явление, о чем свидетельствуют прежде всего значительная вариабельность поведенческих реакций в ответ на введение алкоголя и большое клиническое разнообразие течения алкоголизма (степень злокачественности процесса), различия в реакциях больных на лечение, а также неодинаковая степень наследственного отягощения [6].

Согласно нашим предыдущим исследованиям [7,8] показателем устойчивости организма к действию стрессовых воздействий различной модальности может рассматриваться уровень общей протеолитической активности (ОПА) тка-

ней, отражающий уровень деградации конформационно модифицированных под влиянием окислительного стресса белков, а также среднемолекулярных «токсичных пептидов» (ТП), содержание которых повышается при действии экстремальных факторов и может сопровождаться развитием различного рода патологий [9–11].

Одним из важнейших подходов к изучению развития и профилактики алкоголизма является поиск биологически активных веществ (БАВ), способных снимать различные нарушения поведения человека, например, регулирующих или модулирующих компоненты тревоги в психической деятельности.

С учетом изложенного целью настоящего исследования было определение уровня ОПА эритроцитов и плазмы крови, а также содержания ТП в сыворотке крови у крыс при длительной алкоголизации и возможности использования БАВ для коррекции выявленных нарушений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведены четыре серии опытов на крысах-самцах, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные 1-й серии (n=15) служили в качестве контроля. Во 2-й серии животных (n=18) подвергали трехнедельной алкоголизации; в 3-й серии животные (n=25) принимали на фоне 21-дневной алкоголизации «биосластин» (БС) – вытяжку из солодкового корня, обогащенную до 70–80% основным компонентом – глицирризино-

вой кислотой; в 4-й серии крысам (n=25) давали пропротен-100 (ППТ) – препарат, содержащий потенцированные антитела к мозгоспецифическому регулятору – белку группы S-100 в разведении С 1000.

Индивидуально-типологические особенности поведения (ИТОП) животных определяли на основании корреляционного анализа [12] данных, полученных в двух тестах – «открытое поле» и «эмоциональный резонанс» [13,14]. При этом крысы были условно разделены на три группы: с сильным, слабым и промежуточным «типами» ВНД.

При алкоголизации крысам ежедневно вливали per os первые 10 сут по 10 мл, а в следующие 11 сут – по 15 мл 15% раствора этанола.

Экспериментальным животным, наркотизированным нембуталом (4 мг/100 г массы тела, внутримышечно), для предотвращения свертывания крови вводили гепарин (500 МЕ/кг внутривенно), и кровь для анализа брали из сонной артерии. После ее центрифугирования в течение 10 мин при 1000 g эритроциты дважды промывали средой инкубации, содержащей 150 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4).

Содержание ТП (в ед. оптической плотности) в сыворотке крови определяли спектрофотометрически [11].

Уровень ОПА плазмы крови и эритроцитов определяли с использованием ранее описанной методики [7]. Калибровочную кривую строили с использованием аминокислоты фенилаланин, и полученные данные выражали в мкг фенилаланина (Фен) на 1 мл (для эритроцитов) на 1 ч инкубации. Контроль – протеолитическая активность проб без инкубации.

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel, и изменения параметров с учетом непарного критерия Фишера – Стьюдента считали достоверными при p ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс сильного, промежуточного и слабого «типов» в контрольной группе содержание ТП равнялось соответственно 0,100±0,009, 0,142±0,010 и 0,173±0,011, т.е. количество этих веществ у животных слабого «типа» было на 73,0% выше, чем у крыс сильного «типа».

При этом уровень ОПА эритроцитов и плазмы крови, наоборот, был несколько выше у крыс сильного «типа» – 382,92±18,12 и 187,93±±9,13 мкгФен/мл · ч соответственно, снижаясь до 365,73±17,24 и 165,34±8,34 мкгФен/мл · ч у животных промежуточного «типа», а минимальным – у крыс слабого «типа» – 349,68±14,14 и 153,74±8,10 мкгФен/мл · ч.

При 21-дневной алкоголизации животных сильного, промежуточного и слабого «типов» содержание ТП в крови повышалось соответственно до 0,243±0,010, 0,285±0,014 и 0,305±0,018 (во всех случаях p<0,001), что отражено на рис. 1.

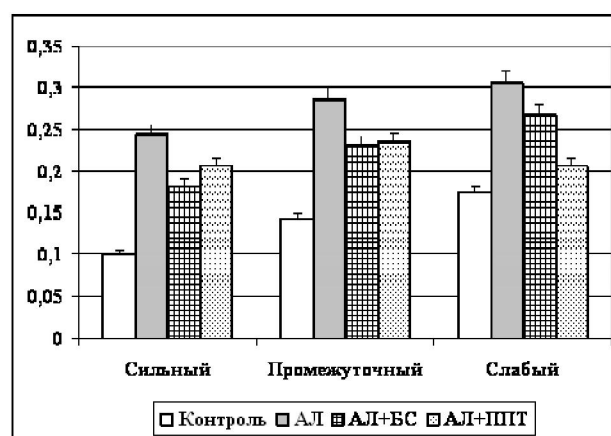


Рис. 1. Изменение содержания «токсичных пептидов» (отн.ед.) в сыворотке крови у крыс разных «типов» ВНД при длительном приеме только алкоголя (АЛ), а также при его сочетании с биоэластилином (БС) и пропротеном-100 (ППТ)



Рис. 2. Изменение уровня общей протеолитической активности эритроцитов (мкгФен/мл·ч) у крыс разных «типов» ВНД при длительном приеме только алкоголя (АЛ), а также при его сочетании с биоэластилином (БС) и пропротеном-100 (ППТ)

При этом у крыс сильного, промежуточного и слабого «типов» после алкоголизации уровень активности протеаз эритроцитов снизился до 324,80± 16,11 (p<0,05), 315,72±15,29

($p < 0,05$) и $303,39 \pm 14,25$ ($p < 0,05$) мкгФен/мл · ч, соответственно (рис. 2), а плазмы крови – до $181,62 \pm 9,18$, $157,41 \pm 7,14$ и $136,51 \pm 6,74$ мкгФен/мл · ч (рис. 3).

При одновременном поступлении в организм крыс алкоголя и БС выявлены меньшие по сравнению с приемом одного спирта сдвиги регистрируемых показателей. Так, содержание ТП в сыворотке крови у животных сильного, промежуточного и слабого «типов» равнялось $0,181 \pm 0,009$, $0,231 \pm 0,012$ и $0,266 \pm 0,014$ ед. оптической плотности соответственно (см. рис. 1). При этом уровень ОПА эритроцитов у крыс трех «типов» составлял $397,71 \pm 19,22$, $348,54 \pm 16,14$ и $316,23 \pm 14,21$ мкгФен/мл · ч (см. рис. 2), а плазмы крови – $186,29 \pm 8,45$, $163,39 \pm 7,87$ и $144,52 \pm 7,01$ мкгФен/мл · ч (см. рис. 3).

При использовании препарата ППТ на фоне алкоголизации содержание ТП в сыворотке крови у крыс сильного, промежуточного и слабого «типов» равнялось $0,206 \pm 0,010$, $0,234 \pm 0,014$ и $0,206 \pm 0,011$ ед. оптической плотности соответственно (см. рис. 1). На этом фоне уровень ОПА эритроцитов у крыс трех «типов» составлял $338,92 \pm 17,11$, $320,41 \pm 15,41$ и $310,33 \pm 14,17$ мкгФен/мл · ч (см. рис. 2), а плазмы крови – $182,21 \pm 8,55$, $159,21 \pm 7,54$ и $138,24 \pm 6,71$ мкгФен/мл · ч (см. рис. 3).

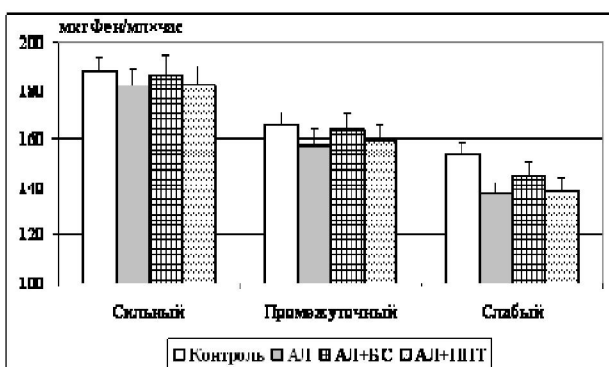


Рис. 3. Изменение уровня общей протеолитической активности плазмы крови (мкгФен/мл·ч) у крыс разных «типов» ВНД при длительном приеме только алкоголя (Ал), а также при его сочетании с биосластилином (БС) и пропротеном-100 (ППТ)

Проведенный нами сравнительный анализ выраженности сдвигов содержания ТП в сыворотке крови у крыс при алкоголизации показал, что более выраженное повышение этого показателя зарегистрировано у крыс сильного «типа»

(на 143,0%), а наименьшее – у животных слабого «типа» (на 76,3%). Максимальное уменьшение уровня ОПА эритроцитов при алкоголизации также выявлено у крыс сильного «типа» (на 15,2%), а минимальное – у животных слабого «типа» (на 13,2%). Иная динамика была характерна для уменьшения уровня ОПА плазмы: более выраженное снижение – у крыс слабого «типа» (на 11,2%), а наименьшее – у животных сильного «типа» (3,4%).

Переходя к обсуждению полученных результатов, следует отметить, что сохранение гомеостаза 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. [15].

Полученные данные свидетельствуют о том, что алкоголь при хроническом действии на организм крыс приводит к развитию окислительного стресса, сопровождаемого повышением токсичности сыворотки крови, причем в большей степени страдают животные, которые по ИТОП относятся к сильному «типу». Одной из возможных причин этого может быть зарегистрированное одновременно падение уровня ОПА крови, поскольку известно, что очищение организма от денатурированных белков осуществляется во многих органах и системах, характеризующихся различным уровнем активности протеолитических ферментов и их ингибиторов [16,17]. Иными словами, алкоголь в большей степени подавляет активность протеаз, причем таковую эритроцитов у животных сильного «типа». Конечно, следует учитывать и действие алкоголя на про- и антиоксидантную систему, поскольку, как свидетельствуют данные литературы, длительное потребление алкоголя приводит к повышению уровня перекисидации липидов в плазме, снижению активностей супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-пероксидазы, а также восстановленного глутатиона, α -токоферола и аскорбиновой кислоты в плазме крови [18], а также в субклеточных компартментах мозга крыс [19] и печени [20].

Как показали исследования, использование биологически активных веществ, таких, как биосластилин, пропротен-100, приводит к снижению негативного эффекта длительной алкоголизации на состояние клеточных мембран, что выражалось в меньших по выраженности сдвигах содержания ТП и уровня ОПА крови. Так, БС оказывал более выраженный защитный эффект у крыс сильного «типа», снижая повышенный при действии алкоголя уровень ТП на 60%, в то время как у животных слабого «типа» – лишь на 24%. В то же время ППТ оказывал большее влияние на крыс слабого «типа», уменьшая действие алкоголя на уровень ТП на 57%, а у животных сильного «типа» – на 37%. Использование БС на фоне алкоголизации повышало уровень ОПА эритроцитов у крыс сильного «типа» на 19%, так что этот показатель даже стал превышать контрольные значения, тогда как у животных слабого «типа» он возрос по сравнению с действием одного алкоголя на 4%. ППТ же не оказывал выраженного влияния на активность протеаз эритроцитов.

Для протеаз плазмы картина действия БС была несколько иной – более выраженное действие (5%) у крыс слабого «типа» по сравнению с 2% у животных сильного «типа». ППТ при этом также не оказывал выраженного действия на уровень ОПА крови.

Полученные нами данные в отношении защитного действия БС, обладающего антиоксидантными свойствами, при алкоголизации находят подтверждение в литературе. Так, показано, что аминокислоты глицин и таурин уменьшают процессы перекисидации липидов и восстанавливают уровень ферментных и неферментных антиоксидантов в мозге и печени [18,20]. Выявлена возможность повышения антиоксидантной способности тканей и подавления образования свободных радикалов при алкоголизации с помощью зеленого чая [21].

Таким образом, можно заключить, что окислительный стресс, вызываемый алкоголизацией крыс, приводит к повышению уровня токсичности крови за счет увеличения содержания средномолекулярных пептидов. При этом этанол подавляет активность протеаз эритроцитов и плазмы, призванных очищать организм от конформационно измененных белков и их токсичных фрагментов. Использование же биосластилина, обла-

дающего антиоксидантными свойствами, но не пропротена-100, приводит к снижению негативного влияния этанола на состояние клеточных мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алинов В.И. Влияние алкоголизма на репродуктивную функцию // Вестник АМН СССР. 198. № 3. С.53-58
2. Анохина И.П. Нейробиологические аспекты алкоголизма // Вестник АМН СССР. 1988. № 3. С.21-27.
3. Sabria J., Torres D., Pasto M. e.a. Release of neurotransmitters from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: differential effects in cortex and hippocampus // *Addict. Biol.* 2003. V.8, № 3. P.287-294.
4. Augustyniak A., Waszkiewicz E., Skrzydlewska E. Preventive action of green tea from changes in the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol // *Nutrition.* 2005. V.21, N 9. P.925-932.
5. Dinu D., Nechifor M.T., Movileanu L. Ethanol-induced alterations of the antioxidant defense system in rat kidney // *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 2005. V.19, N 6. P.386-395.
6. Бартамян М.Е. Генетические подходы к изучению алкоголизма // Вестник АМН СССР. 1988. № 3. С.37-40.
7. 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.111-116.
8. Кольбай И.С. Сопряженность белок-транспортующей и барьерной функций лимфатической системы при экстремальных воздействиях // Тез.докл. 5-го съезда физиол. Казахстана. Караганда, 2003. С.94-95.
9. Hunt J.V., Simpson J.A., Dean R.T. Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins // *Biochem.J.* 1988. V.250, N 1. P.87-93.
10. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application // *Am.J.Med.* 1991. V.91, N 3. P.31S-38S.
11. Волчегорский И.А., Костин Ю.К., Скобелева Н.А. и др. Средние молекулы как эндогенные модуляторы стресса // Пат. физиол. 1994. № 4. С.23-26.
12. Катышева У.Н. Сравнительная характеристика методов невротизации крыс // Вестник КазНУ. Сер.биол. 2004. № 2(23). С.102-104.
13. Hall C.S. Original methods // *J.Comp.Psychol.* 1934. V.18. P.385.
14. Симонов П.В. Условные реакции эмоционального резонанса у крыс // Нейрофизиологический подход к анализу внутривидового поведения. М., 1976. С.6.
15. Саркисов Д. С., Пальцев М. А., Хитров Н. К. Общая патология человека. М.: Медицина, 1997. 356 с.
16. 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.
17. Локушина Л.А. Протеиназы плазматической мембраны лимфоидных клеток и их биологические функции // Биорг. химия. 1998. Т.24, № 5. С.323-331.
18. Pushpakiran G., Mahalakshmi K., Anuradha C.V. Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues // *Amino Acids.* 2004. V.27, N 1. P.91-96.

19. Reddy S.K., Husain K., Schlorff E.C. et al. Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions // *Neurotoxicology*. 1999. V. 20, N 6. P.977-987.

20. Senthilkumar R., Viswanathan P., Nalini N. Effect of glycine on oxidative stress in rats with alcohol induced liver injury // *Pharmazie*. 2004. V.59, N 1. P.55-60.

21. Skrzydlewska E., Augustyniak A., Michalak K., Farbiszewski R. Green tea supplementation in rats of different ages mitigates ethanol-induced changes in brain antioxidant abilities // *Alcohol*. 2005. V.37, N 2. P.89-98.

Резюме

Егеуқұйрықтарда жүргізілген тәжірибелерде алкогольмен қоздырылған тотығу стресс кезіндегі орта-молекулалық пептидтің мөлшері көбеюімен байланысты қанның ұлағыштығын көтеру көрсетілген. Сонымен этанол ағзаны кон-

формациялық өзгерген ақуыздар мен олардың уландырғыш қалдықтардан тазартуды қамтамасыз ететін эритроциттер мен плазма протеазалардың белсенділігін жояды. Тотықтырғыштарға қарсы қасиеті бар биосластиннің, бірақ пропротен-100 емес, қолдану клетка мембранасының күйіне этанолдың жағымсыз әсерін төмендетуге әкеледі.

Summary

In experiments on rats it was shown that the oxidative stress evoked by chronic ethanol consumption led to an increase in blood toxicity level because of the elevation of medium-size peptides content. At the same time alcohol suppresses the activity of erythrocytes and plasma proteases, which are responsible for organism purification from the proteins with the changed conformation and their toxic fragments. The usage of bioslastilin which has some antioxidant properties, but proproten-100, lead to decrease in negative effect of alcohol upon the cell membranes.