

УДК 615.451.13:612.1:616.831-005

**ЭФФЕКТЫ ЭТАНОЛА НА ПРОТЕОЛИЗ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

О. А. Ходос

Витебский государственный медицинский университет

Изучена активность трипсиноподобных и цистеиновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов в экстракте ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке, а также сыворотке крови крыс в условиях отмены этанола после хронической алкогольной интоксикации. Показано, что отмена этанола после хронической алкогольной интоксикации вызывает нарушение физиологического баланса активности протеиназ и их эндогенных ингибиторов в экстракте ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке, особенно выраженное через 1 сутки после его отмены. В сыворотке крови установлено снижение активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина.

Ключевые слова: этанол, протеиназы, ингибиторы, головной мозг.

**ETHANOL EFFECTS ON PROTEOLYSIS IN BRAIN TISSUE
AND BLOOD SERUM OF LABORATORY ANIMALS**

O. A. Khodos

Vitebsk State Medical University

The activity of trypsin-like and cysteine proteinases and their endogenous inhibitors in the brain tissue extract and blood serum of rats in the conditions of the withdrawal from alcohol after chronic alcohol intoxication has been studied. It was shown that the withdrawal from ethanol after the chronic alcohol intoxication led to the disturbances of the physiological balance of the trypsin-like and cysteine proteinases activity and their endogenous inhibitors in the tissue extract of cerebral and cerebellar hemispheres with the most pronounced one on the next day after the withdrawal. The decrease of α_1 -proteinase inhibitor and α_2 -macroglobulin activity were observed in blood serum which proved the changes of proteolysis.

Key words: ethanol, proteinases, inhibitors, brain.

Введение

Этанол обладает тропностью к центральной нервной системе — в головном мозге его концентрация превышает содержание в крови [1]. Этиловый спирт легко преодолевает гемато-энцефалический барьер, при длительных интоксикациях способствует его повреждению, приводя к нарушению функционирования нервной ткани и дегенеративным изменениям головного мозга [2, 3, 4]. Так, хроническое воздействие этанола способно активировать цистеиновую протеиназу каспазу-3, прокаспазу-9 и прокаспазу-3, вызывать расщепление антиапоптозных белков и протеолиз ингибитора ДНКазы, что приводит к фрагментации олигонуклеосомальной ДНК в коре головного мозга и мозжечке [5, 6]. Более того, в результате интенсификации процесса перекисного окисления липидов при хронической интоксикации этанолом может происходить повреждение мембран лизосом и высвобождение протеолитических ферментов, что способствует повреждению клеток тканей. Поэтому, выявление закономерностей изменения активности протеолитических ферментов и их эндогенных ингибиторов в ткани головного мозга при нагрузках этанолом является актуальным.

Цель работы

Оценка активности трипсиноподобных и цистеиновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов в больших полушариях головного мозга, мозжечке и сыворотке крови крыс в условиях отмены этанола после хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы

В опытах использовали половозрелых самцов крыс, средняя масса которых составляла 360 г. Перед проведением эксперимента оценивали чувствительность центральной нервной системы к действию этанола и отбирали животных, предрасположенных к добровольному потреблению алкоголя, для чего использовали тест «этанолового наркоза» путем однократного внутривентрикулярного введения 25 % раствора этанола. Экспериментальная модель хронической алкогольной интоксикации достигалась путем предоставления животным опытных групп 15 % раствора этанола *ad libitum* в качестве единственного источника питья [7]. Использование такой концентрации является оптимальным, так как позволяет добиться добровольного потребления животными максимально больших доз этанола, при которых он окажет токсическое действие на

функции органов и систем [8]. Данная модель является наиболее близкой к алкоголизму у людей [9]. Для адаптации животных к вкусу и фармакологическому действию этилового спирта концентрацию растворов этанола ступенчато увеличивали в течение 3 недель от 5 до 15 % (5 % — 1 неделя, 10 % — 2, 15 % — 3) [10]. Раствор этанола у подопытных крыс-самцов находился в поилках клеток круглосуточно. Животные контрольной группы в качестве источника питья получали водопроводную воду. Экспериментальные животные потребляли раствор этанола не менее 29 недель. Регулярно контролировали объем выпитого животными раствора этанола и воды, еженедельно осуществляли взвешивание крыс. Далее прекращали доступ животных к раствору этанола и заменяли его на водопроводную воду. Крыс выводили из эксперимента декапитацией через 1, 3 и 7 суток после прекращения доступа к раствору этанола [9]. Таким образом, были сформированы четыре экспериментальные группы: I — контрольная группа (интактные животные); II — животные, потреблявшие раствор этанола в течение 29 недель, декапитацию которых осуществляли через 1 сутки, III — животные, потреблявшие раствор этанола в течение 29 недель, декапитацию которых осуществляли через 3 суток и IV — животные, потреблявшие раствор этанола в течение 29 недель, декапитацию которых осуществляли через 7 суток после отмены этанола.

Для определения активности протеиназ в сыворотке крови применяли апробированный ранее метод, описанный В. Eglanger и др. [11]. При определении активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина сыворотки крови в качестве базовой использовали методику, предложенную Т. А. Хватовым и В. Б. Беловой

[12]. При изучении эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ в сыворотке крови применяли метод J. F. Lenney [13]. Все эти методики были усовершенствованы нами для исследования протеолиза в сыворотке крови и модифицированы для изучения активности трипсиноподобных и цистеиновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов в экстрактах ткани головного мозга крыс. Модификация данных методов была осуществлена в части вносимого в инкубационную смесь субстрата и источника ферментативной активности.

Для статистической обработки результатов использовали непараметрический метод сравнения независимых групп Краскела-Уоллиса (ANOVA по Краскелу-Уоллису). Если нулевая гипотеза отклонялась, то принимали альтернативную гипотезу о различии групп и далее проводили парное сравнение групп с использованием непараметрического теста Манна-Уитни, применяя поправку Бонферрони при оценке значения p [14].

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования экстракта ткани больших полушарий головного мозга показали, что активность трипсиноподобных протеиназ в нем через 1 сутки после прекращения доступа животных к раствору этилового спирта увеличилась по сравнению с контролем на 94,59 % ($p = 0,0042$), тогда как через 3 и 7 суток она не отличалась от контрольных значений ($p = 0,4750$, $p = 0,1985$ T (таблица 1, рисунок 1).

Активность трипсиноподобных протеиназ в экстрактах ткани мозжечка крыс через 1 сутки после отмены этанола увеличивалась на 88,01 % по отношению к контролю ($p = 0,0066$). Через 3 и 7 суток отмены этанола данный показатель соответствовал контрольным значениям ($p = 0,5677$ и $p = 0,1160$ соответственно) (рисунок 1).

Таблица 1 — Активность трипсиноподобных и кислых лизосомальных цистеиновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов в экстракте ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке крыс

Показатель	Контрольная группа	1 сутки после отмены этанола	3 суток после отмены этанола	7 суток после отмены этанола
Большие полушария головного мозга				
Активность трипсиноподобных протеиназ, нмоль/ч·мг белка	50,604 (42,013–68,243)	98,472* (77,794–128,230)	56,925 (40,362–87,339)	44,245 (38,607–55,843)
Активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ, нмоль/с·мг белка	0,488 (0,429–0,508)	0,388* (0,352–0,403)	0,374* (0,353–0,401)	0,363* (0,343–0,392)
Активность цистеиновых протеиназ, нмоль/ч·мг белка	18,737 (14,844–21,822)	31,395 (21,482–38,951)	32,293* (22,969–46,032)	22,773 (6,240–57,180)
Активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ, нмоль/ч·мг белка	20,736 (15,545–29,109)	19,391 (9,290–45,069)	15,557 (7,589–28,176)	24,335 (17,804–31,662)
Мозжечек				
Активность трипсиноподобных протеиназ, нмоль/ч·мг белка	35,054 (25,079–49,423)	65,908* (52,100–87,900)	34,709 (27,315–54,254)	28,367 (24,398–33,957)

Окончание таблицы 1

Показатель	Контрольная группа	1 сутки после отмены этанола	3 суток после отмены этанола	7 суток после отмены этанола
Активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ, нмоль/с·мг белка	0,498 (0,478–0,549)	0,451* (0,415–0,467)	0,444 (0,421–0,488)	0,481 (0,433–0,509)
Активность цистеиновых протеиназ, нмоль/ч·мг белка	28,243 (22,914–35,898)	37,782 (28,656–50,073)	32,486 (25,546–39,434)	27,918 (23,326–34,497)
Активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ, нмоль/ч·мг белка	26,964 (19,725–31,066)	21,099 (9,836–25,319)	24,316 (20,366–30,339)	22,834 (13,942–27,048)

Примечания: 1. Данные представлены в виде медианы (–95% +95%) – доверительный интервал. 2.* — статистически значимые различия показателей по отношению к контролю

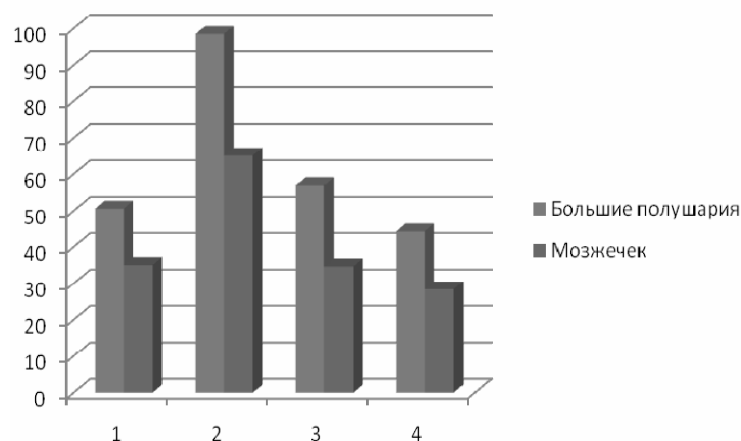


Рисунок 1 — Активность трипсиноподобных протеиназ в экстракте ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке крыс при хронической алкогольной интоксикации длительностью 29 недель, нмоль/ч·мг белка. 1 — контроль; 2 — отмена этанола через 1 сутки; 3 — отмена этанола через 3 суток; 4 — отмена этанола через 7 суток

Было обнаружено, что активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ в экстрактах больших полушарий головного мозга крыс через 1 сутки после отмены алкоголя уменьшается на 20,55 % ($p = 0,0027$) по сравнению с контрольной группой, через 3 суток — снижается на 23,32 % ($p = 0,0042$), через 7 суток —

на 25,69 % ($p = 0,0027$), (рисунок 2). При этом активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ в экстракте ткани мозжечка через 1 сутки отмены этанола по отношению к контролю снизилась на 9,41 % ($p = 0,0027$), тогда как через 3 и 7 суток не отличалась от контроля ($p = 0,0222$ и $p = 0,1160$) (рисунок 2).

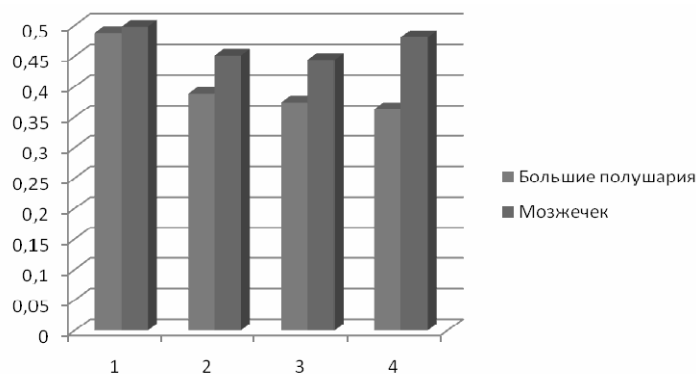


Рисунок 2 — Активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ в экстракте ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке крыс при хронической алкогольной интоксикации длительностью 29 недель, нмоль/с·мг белка. 1 — контроль; 2 — отмена этанола через 1 сутки; 3 — отмена этанола через 3 суток; 4 — отмена этанола через 7 суток

Таким образом, изменения активности трипсиноподобных протеиназ в экстракте ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке крыс при хронической алкогольной интоксикации длительностью 29 недель носят односторонний характер: наблюдается увеличение активности через 1 сутки после отмены раствора этанола и стабилизация данного показателя до уровня контрольных значений на 3 и 7 сутки. Активность эндогенных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ экстрактов ткани больших полушарий головного мозга и мозжечка крыс снижается параллельно через 1 сутки после прекращения доступа животных к раствору этилового спирта, однако в ткани мозжечка к 3 и 7 суткам наблюдается возврат показателя к норме, тогда как в больших полушариях активность остается ниже, чем в контрольной группе. Таким образом, после отмены этанола

восстановление баланса трипсиноподобные протеиназы/эндогенные ингибиторы в мозжечке происходит уже на 3 сутки отмены, тогда как в больших полушариях восстановление баланса не наступает даже через 7 суток после отмены этанола, а активность их ингибиторов остается сниженной.

Активность кислых лизосомальных цистеиновых протеиназ не изменяется по сравнению с контролем через 1 сутки отмены алкоголя ($p = 0,0222$, с учетом поправки Бонферрони p должно быть не менее $0,0083$), через 3 суток увеличивается на $72,34\%$ ($p = 0,0042$), тогда как к 7 суткам вновь устанавливается на уровне контрольных значений ($p = 0,2530$) (рисунок 3). Изменения активности цистеиновых протеиназ в экстракте мозжечка после хронической интоксикации этанолом в течение 29 недель не были статистически значимыми ($p = 0,1480$).

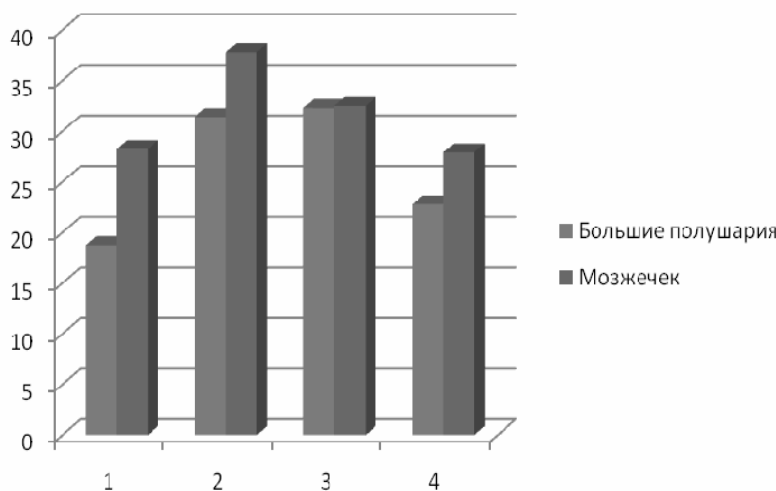


Рисунок 3 — Активность кислых лизосомальных цистеиновых протеиназ в экстрактах ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке крыс при хронической алкогольной интоксикации длительностью 29 недель, нмоль/ч·мг белка. 1 — контроль; 2 — отмена этанола через 1 сутки; 3 — отмена этанола через 3 суток; 4 — отмена этанола через 7 суток

Активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ в экстрактах ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке не изменялась ни в один из сроков отмены этанола ($p = 0,4915$, $p = 0,2158$).

Эксперименты показали, что при хронической интоксикации раствором этанола в течение 29 недель активность кислых лизосомальных цистеиновых протеиназ в экстрактах ткани больших полушарий головного мозга крыс по сравнению с контролем увеличивается на $72,34\%$ через 3 суток после отмены алкоголя, тогда как через 1 и 7 суток устанавливается на уровне контрольных значений. В экстракте мозжечка крыс статистически значимых изменений активности цистеиновых

протеиназ выявлено не было. Активность эндогенных ингибиторов кислых лизосомальных цистеиновых протеиназ в экстрактах ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке крыс не изменялась по отношению к контролю ни в один из изучаемых периодов отмены этанола.

В сыворотке крови изменения общей протеолитической активности не были статистически значимыми ($p = 0,1797$). Анализ результатов исследований общей протеолитической активности сыворотки крови указывает на увеличение медианы в 1 сутки после отмены этанола с $23,374$ нмоль/с·л (в контрольной группе) до $37,399$ нмоль/с·л, но это изменение активности не является статистически значимым.

Таблица 2 — Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в сыворотке крови

Показатель	Контрольная группа	1 сутки после отмены этанола	3 суток после отмены этанола	7 суток после отмены этанола
Общая протеолитическая активность сыворотки крови, нмоль/с·л	23,374 (19,927–33,648)	37,399 (30,634–45,410)	23,634 (14,251–41,500)	20,777 (11,833–40,283)
Активность α_1 -протеиназного ингибитора сыворотки крови, мкмоль/с·л	5,721 (5,467–5,796)	5,434 (5,298–5,569)	5,066* (4,970–5,204)	5,178* (4,794–5,313)
Активность α_2 -макроглобулина, мкмоль/с·л	0,228 (0,183–0,270)	0,108* (0,090–0,124)	0,130* (0,101–0,147)	0,118* (0,091–0,136)
Активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ отн. ед.	4030,732 (3791,388–4168,759)	4089,834 (3884,312–4423,015)	4036,643 (3843,400–4206,241)	4143,026 (3576,199–4477,385)

Примечания: 1. Данные представлены в виде медианы (–95 % – +95 %) — доверительный интервал. 2.* статистически значимые различия показателей по отношению к контролю

По сравнению с контролем через 1 сутки отмены этанола активность α_1 -протеиназного ингибитора не изменяется ($p = 0,1043$), тогда как через 3 суток снижается на 11,44 % (0,0027), а через 7 суток — на 9,49 % ($p = 0,0027$) (рисунок 4).

Активность α_2 -макроглобулина снижалась по сравнению с контролем через 1 сутки после отмены этанола на 52,63 % ($p = 0,0044$), 3 суток — 42,98 % ($p = 0,0027$), 7 суток — 48,24 % ($p = 0,0027$) (рисунок 5).

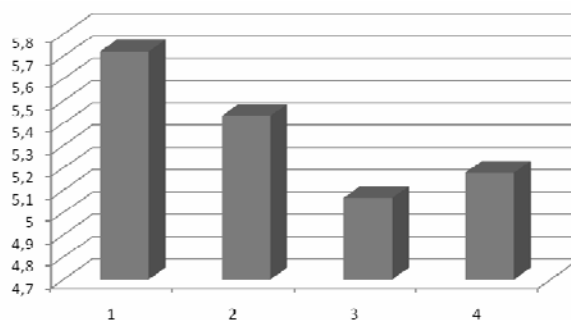


Рисунок 4 — Активность α_1 -протеиназного ингибитора сыворотки крови при хронической алкогольной интоксикации длительностью 29 недель, мкмоль/с·л. 1 — контроль; 2 — отмена этанола через 1 сутки; 3 — отмена этанола через 3 суток; 4 — отмена этанола через 7 суток

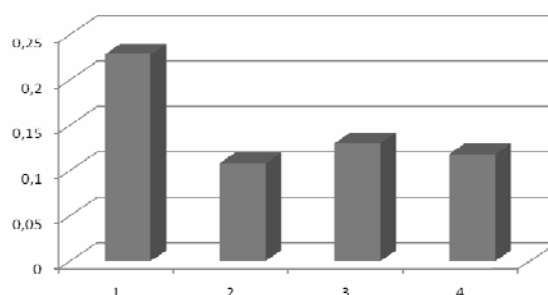


Рисунок 5 — Активность α_2 -макроглобулина сыворотки крови при хронической алкогольной интоксикации длительностью 29 недель, мкмоль/с·л. 1 — контроль; 2 — отмена этанола через 1 сутки; 3 — отмена этанола через 3 суток; 4 — отмена этанола через 7 суток

Активность эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ в сыворотке крови крыс данных экспериментальных групп не подвергалась изменению ни через 1, 3, ни через 7 суток после отмены этанола ($p = 0,4762$).

Показано, что при интоксикации этанолом наблюдается ишемия головного мозга и в первую очередь повреждаются именно клетки глии. Согласно литературным данным при ушибе, размозжении, ишемии мозга наблюда-

ется активация протеиназ в головном мозге, что в первую очередь связывают с повреждением микроглиальных клеток, которые обладают мультиферментным комплексом протеиназ. Повышение активности трипсиноподобных протеиназ содействует развитию деструктивных и воспалительных процессов в тканях. С другой стороны, увеличение активности протеолитических ферментов способствует устранению поврежденных белков из ткани.

Снижение активности α_1 -протеиназного ингибитора может быть связано с активацией процессов перекисного окисления, которое вызывает окислительную модификацию α_1 -протеиназного ингибитора. Одной из причин снижения активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина сыворотки крови также может быть связано с нарушением белоксинтезирующей функции, что наблюдается при хронической интоксикации этанолом.

Полученные данные свидетельствуют, что после хронической интоксикации этанолом длительностью 29 недель происходит нарушение нормального физиологического баланса в системе протеиназы/эндогенные ингибиторы в ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке, а также в сыворотке крови экспериментальных животных. Наиболее выраженные изменения активности протеиназ и их ингибиторов наблюдаются в 1 сутки после отмены этанола. По всей видимости, снижение активности ингибиторов и увеличение активности протеолитических ферментов может приводить к деструктивным изменениям в больших полушариях головного мозга и мозжечке, а истощение ингибиторного потенциала сыворотки крови также негативно сказываться на функционировании других органов и систем.

Выводы

1. При хронической алкогольной интоксикации в условиях отмены этанола отмечается нарушение физиологического баланса активности протеиназ и их эндогенных ингибиторов в экстракте ткани больших полушарий головного мозга и мозжечке, особенно выраженное через 1 сутки после отмены алкоголя.

2. Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина сыворотки крови сни-

жается, при этом общая протеолитическая активность не изменяется.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Калинина, А. Г. Токсичность алкогольных напитков / А. Г. Калинина, А. В. Савельев, А. Ю. Костин // Материалы I Российского национального конгресса по наркологии с международным участием, Москва, 24–27 нояб. 2009г. / ФГУ НИЦ наркологии Минздравсоцразвития России; редкол.: Е. В. Борисова [и др.]. — М., 2009. — С. 11–12.
2. Matsumoto, H. Alcoholism: protein expression profiles in a human hippocampal model / H. Matsumoto, I. Matsumoto // Expert review of proteomics. — 2008. — Vol. 5, № 2. — P. 321–331.
3. Новые возможности лечения алкогольной болезни. Перспективы применения Цереброфурина / И. Ф. Беленичев [и др.] // Международный неврологический журнал. — 2009. — № 1. — С. 166–180.
4. Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: microglia proliferation precedes neurogenesis / K. Nixon [et al.] // Neurobiology of disease. — 2008. — Vol. 31, № 2. — P. 218–229.
5. Ethanol Induces Cell Death by Activating Caspase-3 in the Rat Cerebral Cortex / J. Y. Han [et al.] // Molecules and Cells. — 2005. — Vol. 20, № 2. — P. 189–195.
6. Самуилов, В. Д. Программируемая клеточная смерть / В. Д. Самуилов, А. В. Олескин, Е. М. Лагунова // Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 8. — С. 1029–1046.
7. Reduction of Alcohol Dependence in Rats after Carotid Glomectomy / O. N. Serova [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2007. — Vol. 144, № 5. — P. 650–652.
8. Kharchenko, N. K. Involvement of Serotonin in the Pathogenesis of Alcohol Addiction / N. K. Kharchenko, V. N. Synytsky, Z. A. Koval // Neurophysiology. — 2002. — Vol. 34, № 5. — P. 366–372.
9. Пархоменко, Ю. М. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс, вызванные длительным приемом алкоголя / Ю. М. Пархоменко, Г. В. Донченко, С. Ю. Филиппук // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 79, № 3. — С. 61–69.
10. Nerve growth factor restores mRNA levels and the expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus of rats submitted to chronic ethanol treatment and withdrawal / M. M. Paula-Barbosa [et al.] // Journal of Neurocytology. — 2001. — № 30. — P. 195–207.
11. Erlanger, B. F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / B. F. Erlanger, N. Kokowsky, M. Cohen // Arch Biochem. Biophys. — 1961. — Vol. 95, № 2. — P. 271–278.
12. Хватов, В. Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: метод. рек. / В. Б. Хватов, Т. А. Белова. — М., 1981. — 27 с.
13. Thermostable endogenous inhibitors of cathepsins B and H / J. F. Lenney [et al.] // Eur J Biochem. — 1979. — Vol. 101, № 1. — P. 153–161.
14. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. — М.: МедиаСфера, 2003. — 312 с.

Поступила 28.07.2011

УДК [612.82:615.272.6:517.21]-092.9

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ ДИНИЛА И СВИНЦА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫСЯТ

И. В. Лях, Е. М. Дорошенко, В. Ю. Смирнов, В. М. Шейбак

Гродненский государственный медицинский университет

Проведена оценка совместного и раздельного введения свинца и динила на концентрацию свободных аминокислот и их производных в гипоталамусе крысят. Показаны изменения изучаемых показателей в гипоталамусе как при раздельном, так и при сочетанном воздействии на организм крысят динила и свинца. Основные сдвиги в уровнях аминокислот и их метаболитов регистрировались в гипоталамусе крысят, получавших свинец. Дополнительное введение на этом фоне динила усугубляло дисбаланс аминокислотного фонда гипоталамуса.

Ключевые слова: динил, свинец, аминокислоты, гипоталамус, крысята.

EFFECT OF INTRAGASTRIC INFLOW OF DINIL AND LEAD ON THE CONCENTRATION OF FREE AMINO ACIDS IN INFANT RATS' HYPOTHALAMUS

I. V. Liakh, E. M. Doroshenko, V. Yu. Smirnov, V. M. Sheibak

Grodno State Medical University

The simultaneous and divided inflow of lead and dinil into the concentration of free amino acids and their derivatives in the hypothalamus of infant rats has been assessed. The changes of the studied indices in the hypothalamus were de-