

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПРО-/АНТИОКСИДАНТЫ И АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ У КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ ДО И ПОСЛЕ КОРРЕКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫМИ МАСЛАМИ

Хильчук М. А., Есауленко Е. Е., Быков И. М.

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия (350063, Краснодар, ул. Седина, 4); e-mail: ilyamb@ksma.ru

В статье представлены результаты исследования состояния системы антирадикальной защиты крови и активности пищеварительных протеиназ (пепсина, трипсина, химотрипсина) в гомогенатах желудка и поджелудочной железы экспериментальных животных (крыс), подвергнутых интоксикации четыреххлористым углеродом. В ходе проведенных исследований установлено, что под действием четыреххлористого углерода в организме крыс наблюдалась активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), дисбаланс в работе ферментов антирадикальной защиты крови (каталазы и супероксиддисмутазы), а также снижение выработки пепсина, трипсина и химотрипсина. Использование льняного масла, масел черного и грецкого орехов у крыс с моделью острого токсического поражения печени, вызванного введением четыреххлористого углерода, способствовало снижению интенсивности протекания процессов липопероксидации, нормализации работы ферментативного звена антирадикальной системы крови, а также характеризовалось тенденцией к восстановлению выработки пищеварительных протеиназ. Полученные результаты создают предпосылки для дальнейшего изучения и использования изучаемых растительных масел в комплексном лечении патологических состояний, возникающих после попадания в организм человека различных токсических агентов.

Ключевые слова: интоксикация четыреххлористым углеродом, антиоксиданты, протеиназы, растительные масла.

STATE OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM AND ACTIVITY OF DIGESTIVE PROTEASES IN RATS AFTER ACUTE INTOXICATION BY CARBON TETRACHLORIDE BEFORE AND AFTER CORRECTION WITH VEGETABLE OILS

Khilchuk M. A., Esaulenko E. E., Bykov I. M.

Kuban state medical university RF Ministry of Health, Krasnodar, Russia (350063, M. Sedina street, 4), e-mail: ilyamb@ksma.ru

In our research we show the results of study of state antiradical protection system of blood and activity of digestive proteases (pepsin, trypsin, chymotrypsin) in homogenates of the stomach, pancreas of experimental animals (rats) that were exposed to intoxication by carbon tetrachloride. In course of study we found that there are the activation of lipid peroxidation (LPO), imbalance in enzymes of antiradical protection system (catalase and superoxide dismutase) and the decrease of pepsin, trypsin and chymotrypsin production in rats, which were poisoned by carbon tetrachloride. Using the flax oil and juglans nigra and juglans regia oils helped to reduce intensity of the processes of lipid peroxidation, to normalize enzymatic chain of antiradical protection system of blood and also tend to restore production of digestive proteases when rats have got a model of acute toxic liver injury induced by administration of carbon tetrachloride. These results create a basis for further studying and using these vegetable oils in treatment of pathological conditions after transmission different toxic agents to human body.

Keywords: intoxication by carbon tetrachloride, digestive proteinases, vegetable oils.

Введение

Печень является центральным органом, в котором протекают основные метаболические процессы обмена белков, липидов и углеводов. Также печень выполняет барьерную функцию, защищая внутреннюю среду организма от попадания чужеродных агентов, инактивируя ксенобиотики. В связи с чем заболевания, связанные с токсическим

поражением печени, занимают ведущее место среди патологий, вызывающих необратимые нарушения в функционировании всех систем организма [1].

У животных наиболее близкие к человеку морфологические изменения паренхимы печени возникают после введения в организм четыреххлористого углерода (CCl₄). В связи с чем интоксикация животных CCl₄ в эксперименте является наиболее эффективной моделью как для обнаружения характерных биохимических нарушений, возникающих при воздействии токсического агента, так и для поиска новых лекарственных средств, обладающих гепатотропными свойствами [4].

Предположительно, гепатотоксический эффект CCl₄ обусловлен повреждением клеточных структур свободными радикалами, образующимися при метаболизме этого соединения в эндоплазматическом ретикулеуме печени [8]. Гепатотоксичность является лишь основным проявлением действия тетрахлорметана, тогда как в условиях окислительного стресса образующиеся свободные радикалы способны оказывать повреждающий эффект и на другие органы пищеварительной системы, что особенно заметно при пероральном поступлении CCl₄ в организм человека или животного. Повреждению желудка, кишечника и поджелудочной железы способствуют также нарушения между различными отделами пищеварительной системы, возникающие вторично на фоне формирования острой печеночной недостаточности [5].

В связи с этим проблема изучения биохимических механизмов регуляции функциональной активности пищеварительных желез в условиях воздействия токсических агентов, а также разработка мер, направленных на устранение обнаруживаемых нарушений, в настоящее время является актуальным направлением современной экспериментальной и клинической гепатологии.

Цель настоящего исследования – изучить изменение активности протеиназ желудочно-кишечного тракта крыс, подвергнутых воздействию четыреххлористого углерода, определить патогенетический механизм нарушений и изучить возможность коррекции обнаруженных метаболических изменений при использовании растительных масел.

Материал и методы. В экспериментах использовано 150 белых беспородных крыс самцов весом 150–200 г. В каждой опытной и контрольной группе животные были одного возраста и веса. Они содержались в стандартных условиях, с соблюдением всех правил и международных рекомендаций [3].

Опытные животные были распределены на следующие группы. Первая группа (25 крыс) – интактные животные. Вторая группа (25 крыс) – животные с моделью токсического поражения печени, вызванного введением четыреххлористого углерода, исследование биохимических параметров у которых производилось на 7 сутки после начала эксперимента.

Третья группа (25 крыс) – животные с моделью токсического поражения печени, вызванного введением четыреххлористого углерода, исследование биохимических параметров у которых производилось на 30 сутки после начала эксперимента. Четвертая группа (75 крыс) – животные с предварительно созданным экспериментальным токсическим гепатитом, которым по гастральному зонду вводили изучаемые масла: масло черного ореха – подгруппа IV^A (n=25), масло грецкого ореха – подгруппа IV^B (n=25), льняное масло – подгруппа IV^B (n=25).

Для создания модели острого токсического поражения печени крысам подкожно вводили 50 % масляный раствор CCl₄ из расчета 0,5 мл на 100 г массы тела животного один раз в сутки в течение трех суток [4]. Забор крови и внутренних органов (желудка, поджелудочной железы) для исследования у животных опытных и контрольной групп проводили на 7 и на 30 сутки после начала эксперимента путем декапитации под нембуталовым наркозом (35 мг/кг). Забой крыс производили после их 14-часового голодания, в утренние часы, согласно принятым на этот счет инструкциям и законодательным актам [3]. Органы животных промывали холодным физиологическим раствором, участки слизистой желудка отделяли от серозной оболочки и тщательно измельчали. Также измельчали отдельно поджелудочную железу. Измельченные органы взвешивали и готовили из них 10 %-ные гомогенаты на дистиллированной воде и активировали их. Для активации в гомогенаты желудка добавляли 0,1 н. раствор HCl в расчете 0,2 мл HCl на 1 мл гомогената. Далее инкубировали в водяном термостате в течение 1 часа при температуре 37 °С. После этого центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин, отделяли надосадочную жидкость и определяли в ней активность ферментов.

Для определения активности пепсина в гомогенатах слизистой оболочки желудка был использован экспресс-метод Н. П. Пятницкого [1968]. Метод основан на способности пепсина створаживать забуференное молоко (молочно-ацетную смесь, МАС) при pH 5,0 и температуре 25 °С. Время появления хлопьев казеина в пробирке находится в обратной зависимости от активности фермента. Данный метод позволяет определять количество пепсина не только в условных единицах, но, пользуясь эталонным раствором кристаллического пепсина, и в миллиграммах. Активность фермента выражали в мг/г влажной ткани слизистой оболочки желудка [11]. Определение активности трипсина в гомогенатах поджелудочной железы проводили методом Эрлангера – Шатерникова. Метод основан на способности трипсина расщеплять синтетический субстрат – бензоиларгинин-р-нитроанилид (БАПНА) с образованием окрашенного р-нитроанилида, количество которого, определяемого колориметрически ($\lambda = 410$ нм), пропорционально активности фермента [9]. Активность трипсина выражали в мг на 1 г влажной ткани поджелудочной железы.

Активность химотрипсина в гомогенатах поджелудочной железы определяли по методу Н. П. Пятницкого (1965). Этот метод имеет сходство с методом определения пепсина в желудочном соке и основан на способности фермента свертывать молочно-ацетатную смесь при температуре 35 °С. Активность химотрипсина выражали в условных единицах на 1 г влажной ткани поджелудочной железы [10].

Для выявления наиболее вероятной причины изменения активности пищеварительных протеиназ исследовали активность протекания процессов ПОЛ по реакции между вторичными продуктами липопероксидации и тиобарбитуровой кислотой (определяли содержание в крови ТБК-реактивных продуктов – ТБК-РП) [6], а также проводили изучение активности ферментов антирадикальной защиты эритроцитов – каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Активность СОД определяли по методу В. А. Костюка и соавт. [1990]. Активность каталазы определяли колориметрическим методом по М. А. Королюку и соавт. [1988].

Все исследования были выполнены в день забора крови и внутренних органов.

Полученные экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверным считали различие при $p < 0,05$ [2].

Результаты и обсуждение. Под действием CCl_4 в организме крыс наблюдалось снижение активности протеолитических ферментов желудка и поджелудочной железы (табл. 1). На 7 суток от начала эксперимента активность пепсина снизилась на 51 % ($p < 0,001$), трипсина – на 77,9 % ($p < 0,001$), химотрипсина – на 69,9 % ($p < 0,001$) по сравнению с данными, полученными в контрольной группе. На 30 суток от начала эксперимента наблюдалось увеличение активности протеиназ по сравнению с данными, полученными во II опытной группе. Так, активность пепсина в III группе была выше соответствующего параметра во II на 62 % ($p < 0,001$), трипсина – на 54,2 % ($p < 0,001$), химотрипсина – на 114,6 % ($p < 0,001$). Однако активность всех изучаемых протеаз в III экспериментальной группе была ниже контрольных значений.

Таблица 1

Активность протеолитических ферментов слизистой оболочки желудка и ткани поджелудочной железы крыс при острой интоксикации четыреххлористым углеродом
($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Группы животных		
	I (контрольная)	II (7 суток от начала эксперимента)	III (30 суток от начала эксперимента)

Пепсин, мг/г	1,45±0,06	0,71±0,02 <i>p₂₋₁<0,001</i>	1,15±0,02 <i>p₃₋₁<0,001</i> <i>p₃₋₂<0,001</i>
Трипсин, мг/г	22,68±0,22	5,02±0,08 <i>p₂₋₁<0,001</i>	7,74±0,09 <i>p₃₋₁<0,001</i> <i>p₃₋₂<0,001</i>
Химотрипсин, ед/г	1,36±0,04	0,41±0,01 <i>p₂₋₁<0,001</i>	0,88±0,01 <i>p₃₋₁<0,001</i> <i>p₃₋₂<0,001</i>

Наиболее вероятным механизмом, способствующим снижению образования пищеварительных ферментов, является повреждение железистого аппарата поджелудочной железы и ЖКТ свободными радикалами, образующимися в организме животного под действием CCl_4 . Так, согласно полученным данным, при интоксикации тетрахлорметаном, в крови животных наблюдалась активация процессов ПОЛ и дисбаланс в работе ферментативного звена системы антирадикальной защиты организма. У крыс после введения CCl_4 на 7 сутки наблюдалось повышение содержания ТБК-РП на 74,8 % ($p<0,001$), снижение активности как СОД на 37,2 % ($p<0,001$), так и каталазы на 57,1 % ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой. Вследствие более выраженного ингибирования каталазы, значение коэффициента каталаза/СОД во II группе было ниже на 30,3 % ($p<0,001$) по сравнению с контролем. На 30 сутки эксперимента концентрация ТБК-РП в III группе была выше на 80,0 % ($p<0,001$) по сравнению с данными, полученными во II группе и в 3,1 раза ($p<0,001$) превышала нормальные значения. В крови животных больных III группы активность СОД снижалась на 56,2 % ($p<0,001$) по сравнению с данными в контрольной группе и на 30,2 % ($p<0,01$) по сравнению с показателями во II группе. Изменения в активности каталазы носили однонаправленный характер по отношению к СОД. Так, в гемолизате эритроцитов крыс III группы активность каталазы снижалась на 60,2 % ($p<0,001$) по сравнению с данными в контрольной группе и на 7,0 % ($p<0,001$) по сравнению с показателями во II группе. Значение коэффициента каталаза/СОД в III экспериментальной группе составило $2,75\pm 0,08$ усл. ед., что на 8,3 % ($p<0,02$) ниже по сравнению с данными в контрольной группе ($3,00\pm 0,06$ усл. ед.) и на 36,1 % ($p<0,001$) выше по сравнению с данными во II группе ($2,09\pm 0,08$ усл. ед.).

Введение в организм животных растительных масел способствовало увеличению активности протеолитических ферментов по сравнению с данными, полученными в группе III (табл. 2). В группах животных, получавших лечение маслом черного ореха и льняным маслом, содержание пепсина достигло уровня интактных крыс, под действием льняного масла также нормализовался синтез химотрипсина.

Активность протеолитических ферментов слизистой оболочки желудка и ткани поджелудочной железы животных с моделью острого токсического поражения печени, находящихся на лечении исследуемыми гепатопротекторами (M±m)

Группы крыс	n	Пепсин, мг/г	Трипсин, мг/г	Химотрипсин, ед/г
IV^A (масло черного ореха)	25	1,33±0,02 <i>p_{4A-3}<0,001</i> <i>p_{4A-1}<0,5</i>	18,67±0,13 <i>p_{4A-3}<0,001</i> <i>p_{4A-1}<0,001</i>	1,27±0,01 <i>p_{4A-3}<0,001</i> <i>p_{4A-1}<0,05</i>
IV^B (масло грецкого ореха)	25	1,31±0,02 <i>p_{4B-3}<0,001</i> <i>p_{4B-1}<0,05</i>	18,95±0,21 <i>p_{4B-3}<0,001</i> <i>p_{4B-1}<0,001</i>	1,26±0,01 <i>p_{4B-3}<0,001</i> <i>p_{4B-1}<0,02</i>
IV^B (льняное масло)	25	1,36±0,01 <i>p_{4Г-3}<0,001</i> <i>p_{4Г-1}<0,5</i>	19,47±0,17 <i>p_{4Г-3}<0,001</i> <i>p_{4Г-1}<0,001</i>	1,29±0,17 <i>p_{4Г-3}<0,001</i> <i>p_{4Г-1}<0,5</i>
III (CCl ₄ , 30 суток от начала эксперимента)	25	1,15±0,02	7,74±0,09	0,88±0,01
I (контрольная)	25	1,45±0,06	22,68±0,22	1,36±0,04

Введение в организм животных растительных масел способствовало также выраженному снижению содержания в сыворотке крови ТБК-РП относительно группы сравнения. В IV^A уровень ТБК-РП снизился на 17,6 % ($p<0,001$), в IV^B – на 21,9% ($p<0,001$), в IV^B – на 11,1 % ($p<0,001$) по сравнению с данными, полученными у крыс III группы. Изменение активности ферментов антирадикальной защиты эритроцитов в группах, IV^A, IV^B, IV^B носили однонаправленный характер: наблюдалось выраженное увеличение активности как СОД, так и каталазы по сравнению с данными, полученными в группе III. Так, активность СОД в IV^A группе увеличилась на 54,6 % ($p<0,001$), в IV^B – на 42,4 % ($p<0,001$), в IV^B – на 25,5 % ($p<0,001$). Активность каталазы возросла группе IV^A на 60,3 % ($p<0,001$), в IV^B – на 49,2 % ($p<0,001$), в IV^B – на 33,0 % ($p<0,001$) относительно данных, полученных в группе сравнения.

Биохимические процессы, протекающие в крови, сопоставимы с процессами в клетках других органов, в связи с чем наиболее вероятной причиной увеличения содержания протеолитических ферментов в поджелудочной железе и желудке у экспериментальных животных является антиоксидантное действие растительных масел, способствующее восстановлению нормальной структуры и функции поврежденных клеток.

Выводы

Под воздействием четыреххлористого углерода у крыс наблюдалась активация процессов ПОЛ, дисбаланс в работе ферментативного звена антирадикальной системы крови, следствием чего явилось свободнорадикальное повреждение клеток желудка и

поджелудочной железы, что проявилось снижением выработки протеолитических ферментов указанными органами.

Использование исследуемых растительных масел для лечения экспериментальных животных с моделью острого токсического поражения печени способствовало снижению интенсивности процессов липопероксидации, нормализации работы ферментов антирадикальной защиты, а также характеризовалось тенденцией к восстановлению выработки пищеварительных протеиназ, что создает предпосылки для дальнейшего использования изучаемых растительных масел в комплексном лечении патологических состояний, возникающих после попадания в организм человека различных токсических агентов.

Список литературы

1. Гарбузенко Д. В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при ее повреждении и их практическое значение // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – Т.18, № 6. – С.14–21.
2. Герасимов А. Н. Медицинская статистика: учеб. пособие. – М.: Мед. информ. агентство, 2007. – 480с.
3. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). ETS N 123.
4. Забродский П. Ф., Древко Б. И., Мандыч В. Г., Германчук В. Г., Балашов С. В., Кузьмин А. В. Изменение токсичности и иммунотоксичности тетрахлорметана и карбофоса под влиянием 2,4,6-трифенил-4н-селенопирана и их связь с Р-450-зависимой монооксигеназной системой // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т.71, № 6. – С.42-44.
5. Зайчик А. Ш., Чурилов Л. П. Патохимия (эндокринно-метаболические нарушения). – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2007. – 768 с.
6. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
7. Королева, Л. Р. Современные гепатопротекторы // Российский медицинский журнал. – 2005. – N 2. – С. 35-37.
8. Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Б. Е. Меньщикова [и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
9. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. – М., 1969. – С. 206-210.
10. Пятницкий Н. П. Определение активности химотрипсина по скорости створаживания

молочно-ацетатной смеси / Н. П. Пятницкий, М. Т. Проскураков // Материалы 17-й научн. конференции физиологов юга РСФСР. – Ставрополь, 1969. – Т. 2. – С. 80 - 82.

11. Пятницкий Н. П. Простой способ определения пепсина в желудочном соке / Н. П. Пятницкий // Клинич. медицина. – 1955. – № 4. – С. 74-75.

Рецензенты:

Каде Азамат Халидович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.

Литвинова Татьяна Николаевна, доктор педагогических наук, профессор, профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.