Вопросы медицинской химии, 2001, том 47 №5, с.506-510

УДК 612.354.2.085:577.152.1]:613.863+612.67
©Н.П.Рудько, В.В. Давыдов.

АКТИВНОСТЬ РЕДУКТАЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ.

Н.П.РУДЬКО, В.В. ДАВЫДОВ.

Запорожский государственный медицинский университет 69035, Запорожье,
пр. Маяковского, 26, тел. (0612) 342442,
Эл.почта:dav@nord.vostok.net

В работе проведено исследование активности НАДН: и НАД(Ф)Н: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктаз в микросомах печени взрослых и старых крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу. Показано, что активность обеих редуктаз резко снижена у старых животных. При стрессе у взрослых крыс происходит выраженное уменьшение активности НАДН-редуктазы.

Ключевые слова: редуктазы микросом, печень, стресс, старение, метаболизм ксенобиотиков

ВВЕДЕНИЕ. Данные многочисленных исследований, связанных с изучением цитохрома Р450, указывают на то, что при старении происходит нарушение функционирования микросомальных оксигеназных цепей в печени [1-4]. Цитохром Р450 является терминальным компонентом микросомальной оксигеназной цепи и ему принадлежит особая роль в регуляции скорости гидроксилирования эндогенных метаболитов и ксенобиотиков [5, 6]. Важное значение в обеспечении его функционирования имеют НАДФН- и НАДН - специфичные флавопротеины [5].

В литературе отсутствуют систематизированные сведения о состоянии начальных компонентов микросомальных редокс-цепей при стрессе на поздних этапах онтогенеза. Изучение данного вопроса открывает перспективы в выяснении причин изменения функции печени при старении [7] и установлении роли стресса в формировании возрастной патологии этого органа. Учитывая выше изложенное, целью работы явилось исследование активности НАД(Ф)Н: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктаз в печени взрослых и старых крыс при стрессе.

МЕТОДИКА. В работе использовались 40 крыс линии Вистар самцов, двух возрастов: взрослые (10 - 12 мес) и старые (22 - 25 мес). Животные обеих групп, в свою очередь делились на 2 подгруппы: 1 - интактные и 2 - крысы,

подвергнутые иммобилизационному стрессу, путем фиксации на спине в течение 30 минут.

Эффективность воспроизведения стресса контролировалась патоморфологически и по изменению уровня глюкокортикоидных гормонов в крови [8].

После декапитации животных все последующие процедуры проводили при 2-4°С. Навески отмытой от крови печени использовали для приготовления 10% гомогенатов на 1,15% растворе KCl. Полученные гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали в течение 15 минут при 9000g. Супернатанты повторно центрифугировали при 105000g в течение 60 минут. Полученные осадки суспензировались с 1 мл 1,15% KCl и использовали в качестве грубой микросомальной фракции.

В суспензии грубой микросомальной фракции определялась активность НАДН: и НАД(Ф)Н: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктаз [9]. Содержание белка в пробах измеряли по методу Лоури.

Полученные данные подвергали статистической обработке по методу Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты проведенных исследований представлены в таблице. Из нее видно, что у старых интактных животных имеет место выраженное снижение активности обеих изученных микросомальных редуктаз в печени. Так активность НАДН: и НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктаз у старых крыс была соответственно на 45% и 46% ниже, чем у взрослых животных.

Таблица. Активность редуктаз микросом печени при стрессе у взрослых и старых крыс ($\bar{X} \pm m$; $n = 6$)

Фермент	Взрослые		Старые	
	Интактные	стресс	интактные	стресс
НАДН-редуктаза	189 ±17	119± 5*	105 ± 8**	87 ± 4
НАДФН-редуктаза	16,0±1,2	15,3±2,0	8,6 ± 1,3**	5,2 ± 1,1

Примечание. В каждой группе было по 6 животных. Активность редуктаз выражена в мкмоль/мин на 1 мг белка; * - $p < 0,05$ к интактным; ** - $p < 0,05$ к взрослым интактным крысам.

При иммобилизации взрослых крыс активность НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктазы снижалась на 37% по сравнению с исходной величиной. У старых крыс уменьшение активности этого фермента было выражено в меньшей степени.

Активность НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктазы микросом при стрессе у взрослых и старых животных имела тенденцию к снижению. В большей мере она проявлялась у старых крыс. Однако достоверного изменения величины этого показателя не обнаруживалось.

Проведенные исследования показали, что при старении активность НАДН - и НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктаз в печени крыс снижается. Это снижение выражено в одинаковой мере у обоих ферментов. Причиной возникновения подобного сдвига может быть возрастное ограничение синтеза микросомальных белков [10] или их структурная модификация, а также изменение состава гидрофобного слоя микросомальных мембран, возникающие на поздних этапах онтогенеза за счет стимуляции свободно-радикальных процессов в тканях [11, 12].

Уменьшение активности редуктаз в печени при старении предопределяет

появление возрастных особенностей в формировании ответной реакции гидроксилазных цепей микросом на стресс. Действительно, проведенные исследования показали, что при стрессе возникают условия для ограничения активности НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктазы у взрослых крыс. У старых животных выявляется выраженная тенденция к появлению подобного сдвига.

Оценивая возможные причины снижения активности НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктазы при стрессе, можно предположить, что они связаны со стимуляцией свободно-радикальных процессов в клеточных мембранах [13-15]. Усиление этих процессов сопровождается окислительной модификацией мембранных белков и перекисным окислением ацильных радикалов фосфолипидов [16]. Последнее приобретает особое значение в регуляции микросомальных редуктаз в виду их липидзависимой природы [5, 6].

При иммобилизации старых животных процесс окислительной модификации мембранных фосфолипидов и белков ограничивается. Это обусловлено тем, что характер возникающих при старении метаболических сдвигов соответствует их направленности при стрессе. Подобный факт позволил определить старение как «стресс-возраст-синдром». Полученные нами данные в полной мере укладываются в рамки подобной концепции, впервые высказанной Фролькисом [17].

Анализ полученных данных позволяет высказать предположение о том, что исходно высокий базальный уровень окислительной модификации мембран микросом печени старых животных, снижает чувствительность отдельных их структурных компонентов к стимуляции свободно-радикальных процессов при стрессе. Последнее, в свою очередь, предрасполагает к ограничению чувствительности ткани печени к повреждающему действию стресса при старении [18-20]

Высказанное предположение подтверждается обнаруженным нами фактом уменьшения ингибирующего влияния перекиси водорода, как одной из активных форм кислорода, на активность НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктазы в микросомах печени старых крыс по сравнению со взрослыми животными (рисунок).

НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктаза проявляет более высокую устойчивость к ингибирующему влиянию повреждающих факторов стресса, чем НАДН-специфичный фермент. Ее высокая резистентность к действию неблагоприятных факторов в условиях адекватного обеспечения субстратом (восстановленным НАДФ) позволяет поддерживать стабильный уровень гидроксилирования субстратов в печени при стрессе. Однако в условиях уменьшения концентрации НАДФ в тканях при формирования стрессорной реакции, роль этого фермента в функционировании оксигеназной цепи ограничивается и, наоборот, возрастает значение НАДН: 2,6-дихлор-фенолиндофенол специфичной редуктазы в обеспечении цитохрома P_{450} электронами [5, 6].

Возникающие при стрессе сдвиги со стороны активности НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазы способствуют уменьшению потока электронов с восстановленного НАД в оксигеназную цепь, что в свою очередь, ограничивает скорость реакций гидроксилирования в печени при стрессе.

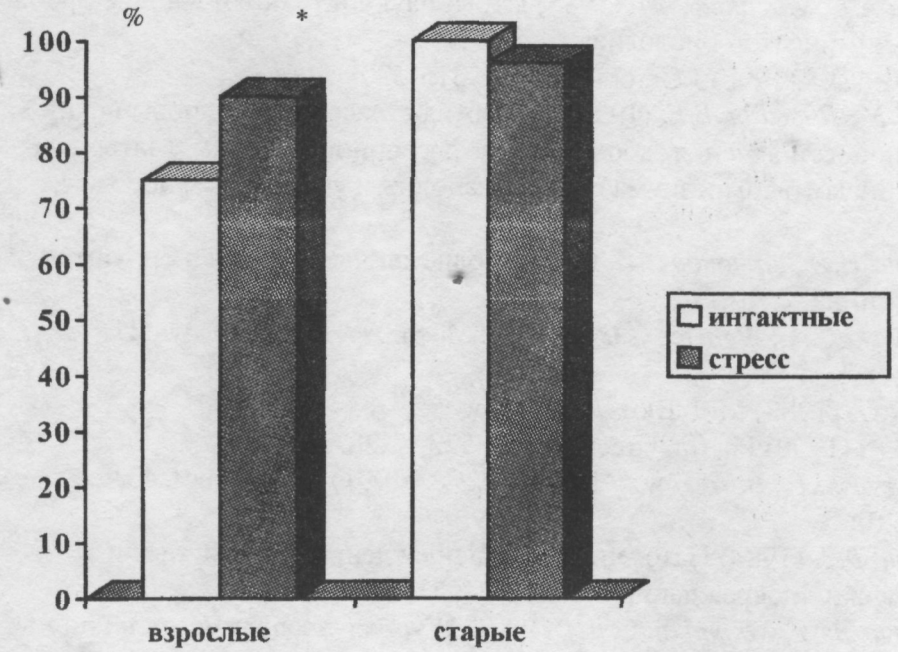

Рисунок.
Влияние 30 мМ H_2O_2 на активность НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазы микросом печени взрослых и старых крыс. Данные представлены в %% изменения активности фермента в среде инкубации, содержащей 30 мМ H_2O_2 к активности в среде, не содержащей H_2O_2.
* - $p < 0,05$ по отношению к интактным животным.

У старых крыс имеет место снижение ингибирующего влияния стресса на НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол-редуктазу микросом печени. Однако и в этом случае активность данного фермента остается на значительно меньшем уровне, чем у взрослых животных. Последнее формирует предпосылки для увеличения скорости процессов гидроксилирования субстратов в печени взрослых крыс при стрессе по сравнению со старыми. Однако для окончательного решения данного вопроса требуется проведение специальных экспериментов связанных с изучением возрастных особенностей в гидроксилировании субстратов в печени. Это будет составлять предмет наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лемешко В.В.* (1985) Цитохром Р450 и охрана внутренней среды человека. Всесоюзн. конфер. Пущино. с.107.
2. *Venn M., Mutch E., James O.F.* (1987) Age and Aging.,**16, N3,** 153 – 158.
3. *Friedman F.K., Robinson R.C., Rifkind J.* (1988). Biochem. Biophys. Res. Commun., **158,** 480 – 484.
4. *Fujita S., Morimoto R., Chiba M.* (1989) Biochem. Pharmacol.,**38,**

3925 – 3931.
5. *Арчаков А.И.* (1975). Микросомальное окисление. М.:Наука .- 327 с.
6. *Карякин А.В., Арчаков А.И.* (1985) Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. **5,** 38 – 81.
7. *Schmucker D.S.*(1998) J.Gerontol., **53A,** 315-320.
8. *Швец В.Н., Давыдов В.В.* (1992) Биохимия стресса и пути повышения эффективности лечения заболеваний стрессорной природы. Материалы всеукраинского симпозиума с международным участием. Запорожье. с.64 -67.
9. *Карузина И.И., Арчаков А.И.* (1977) Современные методы в биохимии. М.:Медицина, с. 49 – 62.
10. *Blazejowski C.A., Webster G.C.* (1983). Mech. Ageing. and Dev , **21,** 345 – 356.
11. *Cutler R.G.* (1985) Mol. Biol. Aging.Proc., **5,** 15 – 201.
12. *Gille I.I.P.* (1990) Pharm. Urecbl., **125,** 523 – 528.
13. *Ceremuzynski L., Barcikowski B., Lewicki Z.* (1991) Exp.Pathol.,**43,** 213 – 220.
14. *Меерсон Ф.З.* (1984) Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.- М.:Медицина.
15. *Микаелян Э.М., Мкртчан С.Л.* (1987). Журнал экспериментальной и клинической медицины. **27,** 119 – 124.
16. *deZwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E.* (1999) Free Radical Biol.Med., **26, N1-2,** 202 -226.
17. *Фролькис В.В.* (1991) Физиологический журнал. **37,** 3 -11.
18. *Lakatta E.G.* (1980) Fed. Proc., **39,** 3173 – 3177.
19. *Mahdi H.* (1983) Arch. Biochem., **96,** 354 – 355.
20. *Docherty I.R.* (1990) Pharmacol. Rev., **42,** 103 - 126.

Поступила 21.04.00.

THE REGULATION OF LIVER MICROSOMAL REDUCTASES ACTIVITY IN ADULT AND OLD RATS DURING STRESS

N.P.RUDKO, V.V.DAVYDOV

State Medical University, Mayakowsky av., 26, Zaporozhye,69035,Ukraine
Tel. (0612) 342442, E-mail: dav@nord.vostok.net

The activity of NADH: and NAD(P)H:2,6-dichlorphenolindophenol reductases was investigated in liver microsomes of adult and old rats during immobilizing stress. There significant decrease of both reductases was found in old animals. Pronounced decrease of NADH:2,6-dichlorphenolindophenol reductase activity was found in adult immobilized rats.

Key words: microsomal reductases, liver, stress, aging, xenobiotics metabolism.