

УДК 577.142.1

© Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОСОМАЛЬНОЙ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ И ИНДУКЦИИ АРОХЛОРОМ 1254.

Н. В. Прокопьева, Л. Ф. Гуляева, Н.Е. Полякова.

Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, г. Новосибирск,
630117, ул. Тимакова 2; факс(3832)-32-31-47.

При введении Арохлора 1254 животным в начале заболевания острым панкреатитом, активности изоформ цитохрома P450: 1A1, 1A2, 2C6 на 2 и 4 сутки были значительно выше по сравнению с контрольной группой животных.

У предварительно индуцированных Арохлором 1254 больных панкреатитом крыс наблюдалось также увеличение специфических активностей исследованных изоформ по сравнению с индуцированными здоровыми животными.

Таким образом, у индуцированных больных панкреатитом животных, независимо от схемы введения Арохлора 1254, индуцибельность исследуемых изоформ цитохрома P450 не только сохранилась, но и была выше по сравнению с ложнооперированными индуцированными животными.

Ключевые слова: острый панкреатит, цитохром P450, индукция, арохлор 1254.

ВВЕДЕНИЕ. Механизмы патогенеза острого панкреатита на сегодняшний день до конца не исследованы. Известно, что ранний период острого панкреатита обусловлен поражением поджелудочной железы и ферментной токсемией. Высокий уровень активности ферментов поджелудочной железы и различных биологических веществ, приводит не только к локальным повреждениям в самой поджелудочной железе, но и вызывает системные патологические изменения в других тканях организма, включая и печень. У большинства больных с этой патологией наблюдается воспалительно-дегенеративные изменения в печени, сопровождающиеся изменением активности ряда ферментов, таких как аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, фруктозо-1,6-дифосфатаальдозазы, аргиназы, гистидазы [1]. Однако в доступной литературе мы не нашли работ по изучению микросомальной монооксигеназной системы (МОС) при остром панкреатите печени, осуществляющей большинство детоксицирующих реакций в организме человека и млекопитающих. Цитохром P450, являясь ключевым ферментом этой системы, метаболизирует широкий спектр соединений как экзогенного, так и эндогенного происхождения [2,3]. Важной адаптивной реакцией этой системы в ответ на экспозицию чужеродных химических соединений является индукция ферментов. Среди индукторов - Арохлор 1254, представляющий смесь полициклических бифенилов, повышающий активность многих изоформ цитохрома P450 [4], активность которых снижена при остром панкреатите, как было показано нами в предыдущей работе [5]. В связи с этим, представляется актуальным изучить влияние Арохлора

1254 на МОС печени при остром панкреатите, поскольку активность изоформ этого фермента при остром панкреатите остается неизученной.

В настоящей работе проведено исследование активности некоторых изоформ цитохрома Р450 на 2-е и 4-е сутки течения острого панкреатита и изучены результаты влияния Арохлора 1254 на эти активности.

МЕТОДИКА. В экспериментах использовали крыс-самцов породы Вистар весом 180 г. Экспериментальный острый панкреатит вызывали [6] путем интраоперационной травматизации поджелудочной железы без нарушения ее серозного покрова [7]. Индукцию микросомальных ферментов вызывали однократным внутрибрюшинным введением Арохлора 1254, разведенного маслом, в дозе 300 мг/кг веса.

Животные были разделены на семь экспериментальных групп.

Первую группу составили животные, у которых экспериментальный острый панкреатит длился 48 и 96 часов. Контролем служили ложнооперированные крысы.

Второй группе животных одновременно вводили индуктор и моделировали острый панкреатит; исследования проводили через 48 часов с момента заболевания. В качестве контроля были взяты ложнооперированные и аналогично индуцированные крысы.

В третьей группе одновременно с моделированием острого панкреатита крысам вводили масло; животных забивали на второй день заболевания. Контролем служили ложнооперированные обработанные маслом животные.

Четвертой группе животных Арохлор 1254 вводили на вторые сутки заболевания острым панкреатитом; исследования проводили спустя 96 часов с момента заболевания. В качестве контроля были взяты ложнооперированные и аналогично индуцированные животные.

В пятой группе крысам вводили масло на вторые сутки острого экспериментального панкреатита; забивали животных спустя 96 часов с момента заболевания. Контролем служили ложнооперированные обработанные маслом животные.

Шестую группу составили животные, которым через двое суток после введения индуктора моделировали острый панкреатит; исследования проводили на второй день заболевания. В качестве контроля были взяты ложнооперированные и аналогично индуцированные животные.

Последней группе крыс вводили масло и спустя двое суток после его введения моделировали острый панкреатит; забивали животных на второй день заболевания. Контролем служили ложнооперированные обработанные маслом животные.

Микросомальную фракцию печени получали традиционным методом дифференциального центрифугирования. Содержание цитохромов Р450 и b5 определяли методом Omura и Sato [7], содержание белка - по методу Лоури [8]. Активность изоформ цитохрома Р 450 определяли в метаболизме ряда алкоксирезорифинов по методу Burke и соавт. [9]. Статистическая обработка результатов была проведена по программе STATGRAPHICS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящей работе проведено исследование специфической активности изоформ цитохрома Р450 1A1 - 7-этоксирезорифин-О-деалкилазы (ЭРОД), 1A2 - 7-метоксирезорифин-О-деалкилазы (МРОД), 2C6 - бензилрезорифин-О-деалкилазы (БРОД), 2B1- пентоксирезорифин-О-деалкилазы (ПРОД) в печени крыс на 2-ые и 4-ые сутки течения острого панкреатита и изучены результаты влияния Арохлора 1254 на эти активности.

Из экспериментов с разной схемой введения масла видно, что как в случае 48-часового, так и в случае 96-часового панкреатита, эффект снижения конститутивных активностей сохранялся (табл. 1 и 2). Так, активность ЭРОД при 48-часовом панкреатите была снижена на 30% ($p < 0,01$), в случае 96-часового

Таблица 1. Характеристика МОС печени при остром экспериментальном панкреатите у крыс

Группы животных	Время течения болезни, сутки	Содержание цитохрома <i>b5</i> пмоль/мг белка	Содержание цитохрома P450 пмоль/мг белка	О-деацетилазная активность (пмоль резорифина в мин/мг белка)			
				ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
Панкреатит	2	583±85.0	837±106	18.9±4.2*	24.0±10.6**	8.4±4.9**	1.3±0.5**
Контроль	-	694±45.0	872±26	55.2±25.8	64.0±3.4	28.2±13.5	8.3±0.02
Панкреатит	4	682±3.0	1380±23	12.4±0.8**	48.16±2.1**	2.8±0.1**	0.6±0.03**
Контроль	-	744±14.0	2150±145	29.4±0.9	69.93±6.3	6.36±0.9	0.7±0.14

Примечания. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

Таблица 2. Активность ферментов МОС при остром экспериментальном панкреатите крыс, обработанных маслом.

Группы животных	Время течения панкреатита, ч	Время экспозиции масла, ч	Содержание цитохрома <i>b5</i> пмоль/мг белка	Содержание цитохрома P450 пмоль/мг белка	О-деацетилазная активность (пмоль резорифина в мин/мг белка)		
					ЭРОД	МРОД	БРОД
Панкреатит	48	48	499±10	667±85	34.3±3.7**	41.9±6.1**	19.4±0.3
Контроль	-	48	470±47	680±13	49.1±1.9	77.3±6.3	18.5±5.1
Панкреатит	96	48	479±25	561±21	10.9±1.0*	13.9±0.3**	3.3±0.3**
Контроль	-	48	466±9	618±2	13.5±0.3	20.2±0.5	14.0±1.0

Примечания. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

панкреатита - на 20% ($p<0.05$), МРОД на 32-46% ($p<0.01$), БРОД достоверно снижена на 77% ($p<0.01$) лишь при 96-часовом панкреатите. Введение крысам Арохлора 1254 сопровождалось почти 3-х кратным увеличением содержания цитохрома P450, определенного спектрально, тогда как содержание цитохрома *b5* существенно не изменялось (табл. 3). Наряду с увеличением общего количества P450 отмечается и увеличение специфических активностей всех исследованных изоформ, причем величина активностей зависела от схемы введения индуктора.

При сравнении данных таблиц 2 и 3, в экспериментах с введением индуктора одновременно с ложной операцией отмечается увеличение активностей ЭРОД в 22 раза, МРОД в 2,7 раз и БРОД в 7,7 раз, а при введении индуктора через 48 часов после ложной операции - увеличение активностей ЭРОД в 64 раза, МРОД в 6,7 раза и БРОД в 19,7 раза.

При введении индуктора одновременно с операцией моделирования острого панкреатита активность ЭРОД увеличивалась в 42 раза, МРОД в 4,6 раза и БРОД в 8,5 раз по сравнению с неиндуцированными животными. При введении индуктора на фоне 48-часового панкреатита отмечено увеличение активностей ЭРОД в 125 раз, МРОД в 14,2 и БРОД в 39 раз в сравнении с неиндуцированными крысами (ср. табл. 2 и 3). Следовательно, при остром панкреатите усиливается индуцибельность изоформ P450 независимо от сроков введения индуктора, хотя степень увеличения активности ферментов зависит от способа введения Арохлора 1254.

Как видно из таблицы 3, различались и абсолютные значения исследуемых активностей. В печени больных панкреатитом и индуцированных крыс абсолютные значения активности ЭРОД были выше на 26-27% ($p<0.01$) по сравнению с контролем во всех случаях, активность МРОД не имела достоверных различий. Активность БРОД в случае введения индуктора на фоне 48-часового панкреатита была ниже на 46% ($p<0.05$) по сравнению с контролем, при 96-часовом панкреатите она была выше на 14% (статистической достоверности не получено).

ЦИТ Р450 ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Таблица 3. Активность ферментов МОС при остром экспериментальном панкреатите крыс, обработанных Арохлором 1254.

Группы животных	Время течения болезни, ч	Время экспозиции индуктора, ч	Содержание цитохрома b5 пмоль/мг белка	Содержание цитохрома Р450 пмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пкмоль резорифина в мин/мг белка)			
					ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
Панкреатит	48	48	609±81	2326±273	1455±207**	195,5±53,8	165,3±62,5	60,7±4,2
Контроль	-	48	660±68	2706±374	1084±77	213,4±46,6	143,4±16,6	75,0±3,5
Панкреатит	96	48	629±96	2032±367	1365±11**	197,8±44,5	128,7±6,2*	94,3±3,9**
Контроль	-	48	655±11	1748±147	870±25	135,5±107	275,7±85,9	34,3±0,4
Панкреатит	48	96	652±105	2722±638	8516±345**	670±24,9*	1881±13,0*	-
Контроль	-	96	593±33	2968±808	6627±319	721±42,0	1833±11,0	-

Примечания. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Результаты исследований каталитических активностей цитохрома Р450 при моделировании острого панкреатита предварительно индуцированным животным (экспозиция индуктора составила четверо суток, а течение заболевания продолжалось двое суток) представлены в таблице 3. Как у контрольных, так и у больных крыс введение этого индуктора сопровождалось увеличением специфических активностей исследованных изоформ (за исключением 2В1, активность которого не зарегистрирована). У индуцированных больных панкреатитом животных активность ЭРОД была повышена на 28% ($p < 0,01$), МРОД снижена на 18% ($p < 0,01$), БРОД повышена на 2% ($p < 0,01$) в сравнении индуцированными здоровыми крысами. При сравнении данных таблиц 1 и 3 видно, что введение индукторов увеличивало активность изоформ Р450 у больных индуцированных животных для ЭРОД в 3,75 раз, для МРОД в 2,5 раз, для БРОД в 3,4 раза по сравнению с индуцированными ложнопериоперированными животными.

Таким образом, введение индуктора животным в начале заболевания острым панкреатитом повышает активность исследуемых ферментов. У крыс с двухдневным и четырехдневным острым панкреатитом, обработанных Арохлором 1254, индуцибельность исследуемых изоформ цитохрома Р450 не только сохранялась, но и была заметно выше по сравнению с ложнопериоперированными индуцированными животными.

Проведенные исследования активности ферментов при моделировании панкреатита предварительно индуцированным животным свидетельствуют о том, что острый панкреатит не повлиял на активность индуцированных ферментов МОС, а в некоторых случаях, как это показано для СYP 1A1, даже ее усиливал. Следовательно, индуцированные формы цитохрома Р450 в большей степени "защищены" от супрессирующего влияния острого панкреатита, чем его конститутивные формы. Экстраполируя полученные результаты на человека, можно предположить, что у людей с индуцированными ферментами МОС печени (курение, потребление алкоголя, длительное применение лекарственных препаратов) при развитии острого панкреатита сохраняется способность ферментов печени к детоксикации и, следовательно, к метаболизму лекарств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельев В.С. (1983) Острый панкреатит, М.: Медицина, 240 с.
2. Арчаков А.И. (1985) Микросомальное окисление, М: Наука, 327с.
3. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. (1978) Структурные аспекты биохимии монооксигеназ, Новосибирск: Наука (Сибирское отделение), 238с.
4. Gulyaeva L.F., Grishanova A.Ju., Lyakhovich V.V. (1994) J. Biochem., **59**, 383-387.
5. Прокопьева Н.В., Гуляева Л.Ф., Полякова Н. Е. (1999) Вопр. мед. химии, **45**, 321-325.

6. Мичурин В. Ф. (1971) Экспериментальная модель травматического панкреатита у крыс. Республиканский межведомственный сборник "Актуальные вопросы общей и неотложной хирургии" Вып.2. Киев. 181-183.
7. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2379-2385.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
9. Burke M.D., Mayer R.T., Kouri R.E. (1951) Cancer Res., 37, 460-464.

Поступила 02.12.02

CHANGES OF HEPATIC MICROSOMAL MONOOXYGENASE SYSTEM DURING ACUTE PANCREATITIS AND AROCHLOR 1254 INDUCTION IN RATS

N.V.Prokopieva, L.F.Gulyaeva, N.E.Polyakova

Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Timakova 2. Novosibirsk. 630117 Russia; fax: (3832)-32-31-47

The effect of Arochlor 1254 treatment of rats on activities of cytochrome P450 isoforms 1A1, 1A2, 2C6 was investigated under conditions of acute pancreatitis. Irrespectively to the scheme of Arochlor 1254 administration (before the development of pancreatitis, and at various periods after its provocation) cytochrome P450 activities were higher than in corresponding controls.

Key words: acute pancreatitis, cytochrome P450, induction, Arochlor 154.