

УДК 612.354.2.085:577.152.1:613.863+612.67

© Коллектив авторов

СОСТОЯНИЕ АДЕНИЛОВОЙ СИСТЕМЫ В ПЕЧЕНИ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

В.В. Давыдов¹, И.В. Захарченко², В.Г. Овсянников²

¹Институт охраны здоровья детей и подростков АМН,
61153 Украина, г. Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52 А,
тел: +380 572624021, эл. почта: dav@nord.vostok.net

²Государственный медицинский университет, г. Ростов-на-Дону, Россия

Исследовали содержание компонентов адениловой системы в печени взрослых (10 - 12 мес.) и старых (22 – 25 мес.) крыс линии Вистар при иммобилизационном стрессе. Уровень энергетического обеспечения печени старых крыс был ниже, чем у взрослых животных. Иммобилизация крыс сопровождалась характерным снижением содержания отдельных адениловых нуклеотидов. Величина и характер возникающих сдвигов у старых животных была аналогична таковой у взрослых. В работе обсуждаются возможные механизмы компенсации уменьшения содержания АТФ в печени при стрессе у взрослых и старых крыс.

Ключевые слова: адениловые нуклеотиды, печень, стресс, старение

ВВЕДЕНИЕ. В литературе встречаются многочисленные сведения о том, что старение сопровождается уменьшением резистентности организма к действию повреждающих факторов стресса [1,2]. Одной из причин возникновения этого феномена может быть возрастное снижение уровня энергообеспечения клеток тканей внутренних органов [3,4].

Важная роль в адаптации организма к действию неблагоприятных факторов внешней среды принадлежит печени. Исследованиями Деева Л.И. и соавт. (1986) было показано, что при стрессе антиоксическая функция этого органа меняется [5]. Работы Парамоновой Г.И. (1994) позволили выявить возрастную зависимость этого сдвига [6]. Принимая во внимание энергозависимую природу процессов детоксикации, можно предположить существование определенной взаимосвязи между возникновением данного сдвига и возрастными изменениями в мощности систем энергетического обеспечения гепатоцитов при стрессе. Однако до настоящего времени подобные сведения в литературе отсутствуют. С целью выяснения причин изменения функционирования печени в условиях стресса при старении, нами было проведено исследование возрастных сдвигов со стороны адениловой системы печени крыс при иммобилизационном стрессе.

МЕТОДИКА. Работа выполнена на 50 крысах самцах линии Вистар двух возрастов: взрослых (10 - 12 мес.) и старых - (22 – 25 мес.). Обе группы животных в свою очередь были разделены на 3 подгруппы: 1 - интактные, 2 - крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30 минут и 3 - животные, которым за 15 минут до иммобилизации внутрибрюшинно вводили диметилсульфоксид в дозе 175 мг на 100 г массы.

Эффективность воспроизведения стресса контролировали патоморфологически по изменению структуры надпочечников, а также на основании измерения в крови концентрации 11- оксикортикостероидов и катехоламинов [7].

Животных декапитировали и немедленно экстирпировали печень, которую замораживали и хранили до исследования в жидком азоте. Пробы замороженной печени гомогенизировали с 0,4 М хлорной кислотой и центрифугировали. В полученных безбелковых экстрактах проводили количественное определение концентрации адениловых нуклеотидов и неорганического фосфора.

Содержание АТР [8], АДР и АМР [9] определяли спектрофотометрически с помощью энзимологических методов, а неорганического фосфата по методу [10]. На основании полученных данных рассчитывали величины потенциала фосфорилирования ($АТР / АДР + Р_i$) и энергетического заряда печени ($АТР + \frac{1}{2} АДР / АТР + АДР + АМР$) [11].

Результаты исследований подвергали статистической обработке по методу Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Содержание отдельных компонентов адениловой системы в печени взрослых и старых крыс представлено в таблице 1. Из нее видно, что в печени старых животных содержание АТР и АМР на 34 % и 36% соответственно ниже, чем у взрослых крыс. Концентрация неорганического фосфора и АДР у них имеет выраженную тенденцию к увеличению по сравнению с таковой у взрослых животных. Изменения в содержании данных метаболитов у старых крыс сопровождаются снижением на 53% и 4% соответственно величины потенциала фосфорилирования и энергетического заряда печени (табл. 2).

Таблица 1. Содержание компонентов адениловой системы у взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе.

Группа животных Мета- болиты	Взрослые			Старые		
	интактные	стресс	ДМСО + стресс	интактные	стресс	ДМСО + стресс
АТР	3,28±0,06	2,42±0,09	1,75±0,08	2,16±0,07	1,72±0,08	1,88±0,06
АДР	0,74±0,10	0,55±0,04	0,80±0,06	0,80± 0,05	0,55±0,02	0,75±0,25
АМР	0,39±0,03	0,13±0,02	0,44±0,04	0,25±0,03	0,07±0,01	0,30±0,08
Р_i	3,28±0,21	3,9±0,47	3,37±0,23	3,76±0,15	5,40±0,57	5,02±0,96

Примечание. Содержание компонентов адениловой системы выражено в мкмоль/г ткани (сырой вес). Здесь и в таблице 2: * - $p < 0,05$ (к интактным), ** - $p < 0,05$ (к взрослым интактным), ДМСО - диметилсульфоксид. В каждой группе было по 5-6 животных.

Таблица 2. Величина потенциала фосфорилирования, энергетического заряда и суммарное содержание адениловых нуклеотидов в печени взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе.

Группа животных Метаболиты	Взрослые		Старые	
	интактные	стресс	интактные	стресс
Потенциал фосфорилирования	1,56 ± 0,27	1,22 ± 0,20 *	0,74 ± 0,06 **	0,60 ± 0,11
Энергетический заряд	0,83 ± 0,01	0,87 ± 0,01 *	0,80 ± 0,01 **	0,85 ± 0,01 *
Суммарное содержание адениловых нуклеотидов	4,46 ± 0,12	3,10 ± 0,09 *	3,21 ± 0,10 **	2,33 ± 0,09 *

Полученные данные указывают на снижение уровня энергетического обеспечения печени при старении, что вполне укладывается в рамки существующих представлений о характере изменения метаболизма в тканях внутренних органов на поздних этапах онтогенеза [3,4]. В основе формирования этого сдвига может лежать возрастное уменьшение эффективности процессов синтеза АТР и, прежде всего, окислительного фосфорилирования [12].

Снижение уровня энергетического обеспечения печени при старении формирует условия для повышения ее чувствительности к действию повреждающих факторов стресса. Для проверки этого предположения далее было проведено изучение содержания компонентов адениловой системы в печени взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе.

Проведенные исследования показали, что при иммобилизации взрослых крыс происходит уменьшение содержания АТР и АМР в печени на 26% и 64% соответственно по сравнению с их исходным уровнем. Сдвиги аналогичной направленности возникают и у старых животных. Так у старых крыс, подвергнутых иммобилизации, в печени уменьшается концентрация АТР, АДФ и АМР на 30%, 32% и 72% соответственно по сравнению с исходным уровнем. При этом у них на 44% увеличивается содержание неорганического фосфата, по сравнению с его исходной величиной.

Представленные данные свидетельствуют о том, что сдвиги в содержании компонентов адениловой системы в печени взрослых и старых крыс, подвергнутых иммобилизации, имеют сходную величину и одинаковую направленность.

Оценивая возможные причины снижения содержания АТР в печени при стрессе, можно предположить важную роль усиления интенсивности энергозависимых процессов в гепатоцитах и ограничения скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях. В литературе имеются данные о нарушении синтеза АТР в процессе окислительного фосфорилирования в тканях при стрессе [13]. Механизм этого сдвига связывают с разобщением окислительного фосфорилирования за счет стрессорной стимуляции перекисного окисления липидов в клетке.

Вместе с тем, исследования, выполненные на группе животных, которым перед иммобилизацией вводился антиоксидант диметилсульфоксид, указывают на то, что ограничение процессов фосфорилирования АДФ, обусловленное

повышением интенсивности свободнорадикального окисления при стрессе [14-16], не вносит существенного вклада в снижение концентрации АТР в печени (табл. 1). Поэтому основную роль в уменьшении содержания АТР в печени при иммобилизации животных обеих возрастных групп, по всей вероятности, играет увеличение интенсивности энергозависимых процессов и, что следует из данных о защитной роли диметилсульфоксида в отношении снижения содержания АМР, ограничение компенсаторного значения аденилаткиназного пути в поддержании уровня энергетического обеспечения гепатоцитов при стрессе.

Из данных литературы следует, что важное значение в характеристике состояния энергетического обеспечения ткани имеет величина соотношения между концентрацией компонентов адениловой системы [11]. Учитывая это, нами был проведен анализ характера изменений суммарного содержания адениловых нуклеотидов, величины потенциала фосфорилирования и энергетического заряда печени у взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе.

Проведенные расчеты показали (табл. 2), что у взрослых и старых крыс при стрессе происходит уменьшение величины потенциала фосфорилирования на 22% и 19%, а также снижение суммарного содержания адениловых нуклеотидов на 30% и 27% соответственно по сравнению с их исходным уровнем. Вместе с тем, возникающие сдвиги сопровождаются незначительным повышением величины энергетического заряда у взрослых и старых животных на 5% и 6% соответственно по сравнению с его уровнем у интактных крыс (табл. 2).

Принимая во внимание характер полученных данных, можно сделать заключение о том, что иммобилизационный стресс приводит к характерному уменьшению концентрации адениловых нуклеотидов (АТР, АДР и АМР) и увеличению содержания неорганического фосфата в печени. Возникающие сдвиги не сопровождаются уменьшением величины энергетического заряда. Более того, у подвергнутых иммобилизации крыс, происходит его повышение. Учитывая значение показателя величины энергетического заряда в характеристике уровня энергетического обеспечения ткани [11], можно предположить, что увеличение скорости утилизации адениловых нуклеотидов при иммобилизационном стрессе сопровождается включением компенсаторных механизмов, направленных на предупреждение снижения уровня энергетического обеспечения гепатоцитов. Особое значение среди них, в условиях стрессорной стимуляции энергозависимых процессов, по всей вероятности, приобретает усиление аденилаткиназной реакции и повышение скорости утилизации АМР в 5'-нуклеотидазном пути, сопряженном с образованием аденозина.

Механизмы компенсации нарушения энергетического обеспечения печени взрослых и старых крыс имеют сходный характер. Более того, количественная оценка сдвигов в содержании адениловых нуклеотидов и величины энергетического заряда, свидетельствует о том, что эффективность компенсаторных процессов в печени старых крыс не снижается и находится на уровне взрослых животных.

Поддержание высокой эффективности механизмов компенсации энергетических затрат в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды на организм при старении, по всей вероятности, является характерной особенностью гепатоцитов. Именно с ней может быть связано сохранение высокой функциональной активности печени при старении [17]. Тонкие механизмы обнаруженного феномена остаются неясными. Определенное значение среди них могут иметь возрастные особенности в стимуляции процессов субстратного фосфорилирования при стрессе. Их изучение составит предмет наших последующих исследований.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Mahdi H.* (1983) *Arch Biochem.*, **96**, 354-355.
2. *Фролькис В.В.* (1991) *Физиол. ж.*, **37**, 3-11.
3. *Pastoris O., Foppa P., Catapano M., Dossena M.* (1998) *Exp. Gerontology.*, **33**, 303-318.
4. *Фролькис В.В., Мурадян Х.К.* (1992) *Старение, эволюция и продление жизни.* Киев: Наукова Думка.
5. *Деев Л.И., Ахалая М.Я., Кудряшов Ю.Б.* (1986) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **52**, № 8, 26- 28.
6. *Парамонова Г.И.* (1994) *Докл. АН Украины*, **6**, 174-177.
7. *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.
8. *Lamprecht W., Stein P., Heinz P., Weissner H.* (1974) *Methods of Enzymatic Analysis.* New York, London, Academic Press Inc, pp. 1777-1781.
9. *Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H.U.* (1974) *Methods of Enzymatic Analysis.* New York, London, Academic Press Inc, pp. 2127-2131.
10. *Гончар М.В., Монастырский М.В.* (1982) *Лаб. дело*, №1, 29-41.
11. *Atkinson D.E.* (1968) *Biochemistry*, **7**, 4030- 4034.
12. *Nakahara H., Kanno T., Inai Y., Utsumi K.* (1998) *Free Radical. Biol. Med.*, **24**, 85-92.
13. *Меерсон Ф.З.* (1984) *Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических поражений сердца.* – М.: Медицина.
14. *Davydov V.V., Shvets V.N.* (2001) *Exp. Gerontol.*, **36**, 1155-1160.
15. *Seckin S., Alptekin N., Dogru-Abbasoglu S.* (1997) *Pharmacol. Res.*, **36**, №1, 55-57.
16. *Kovacs P., Juranek I., Stankovikova T., Svec P.* (1996). *Pharmazie*, **51**, 51-53.
17. *Schmucker D.L.* (1998). *J. Gerontol. A Biol. Sci.*, **53**, №5, 315-320.

Поступила: 20. 06. 2003

ADENINE NUCLEOTIDE SYSTEM IN ADULT AND OLD RAT LIVER DURING IMMOBILIZATION STRESS

V.V. Davydov¹, I.V. Zakhartchenko², V.G.Ovsjannikov²

¹Laboratory of Age Biochemistry Institute of Adolescent and Children Health Protection, 50-Let VLCSM av., 52A, Kharkov, 61153, Ukraine; e-mail: dav@nord.vostok.net

²Rostov State Medical University, Nakhichevansky st., 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Adenine nucleotide and inorganic phosphate concentrations were studied in livers of adult (10-12 month) and old (22-25 month) Wistar male rats during immobilization stress. Study revealed that level of liver energy provision supply of old rats was lower than in adults. Stress caused reduction of adenine nucleotide concentration in the liver of both adult and old animals.

Key word: adenine nucleotide, liver, stress, aging.