

УДК [612.66+616-092]: 577.15

©Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПЕРВОЙ ЛИНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА ПРИ СТРЕССЕ

Ю.В. Волкова, Л.Л. Сухова, В.В. Давыдов, А.В. Голобородько*

ГУ "Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины",
г. Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52-А, 61153;
эл. почта: davydov@kharkov.com, iozdp@ukrpost.ua

Исследовали активности каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО) и супероксиддисмутазы (СОД) в постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста при стрессе. В условиях кратковременной иммобилизации в постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста отмечено уменьшение активности каталазы и ГПО. При продолжительной иммобилизации, за счёт активации ГПО и СОД в постмитохондриальной фракции печени крыс позднего пубертатного возраста и взрослых животных, происходит активация ГПО и СОД, что не характерно для животных раннего пубертатного возраста.

Ключевые слова: пубертатный возраст, стресс, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза, печень.

ВВЕДЕНИЕ. Ранее нами было показано, что в пубертатном возрасте происходит изменение чувствительности печени к действию прооксидантных факторов стресса [1, 2]. Это указывает на изменение устойчивости данного органа к стрессорному воздействию на этапе полового созревания. Однако механизм возникновения этого сдвига остается не ясным. Можно предположить важную роль в его возникновении возрастного изменения функционирования антиоксидантных систем клеток паренхимы печени. Особое значение, по всей вероятности, могут иметь сдвиги в содержании и активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты, к числу которых относятся супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГПО) и каталаза [3, 4]. Учитывая это, целью работы явилось изучение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты в постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста при иммобилизационном стрессе.

МЕТОДИКА. Работа выполнена на 100 крысах самцах линии Вистар трёх возрастных групп: 1) 1,5-месячные (ранний пубертатный возраст); 2) 2-месячные (поздний пубертатный возраст) и 3) 12-месячные (взрослые половозрелые). Животные указанных возрастных групп делили на 3 подгруппы: 1) интактные; 2) крысы, подвергнутые кратковременному иммобилизационному стрессу путем 30-минутной фиксации на спине к неподвижной опоре и 3) животные, подвергнутые продолжительной иммобилизации. С этой целью их фиксировали на спине, привязывая к неподвижной опоре по 5 часов в день течение 2 дней. Эффективность воспроизведения стресса оценивали по уровню 11-ОКС в крови [5].

Немедленно после окончания иммобилизации крыс декапитировали под лёгким эфирным наркозом. Извлекали печень и помещали её в ледяной физиологический раствор. Навеску ткани печени гомогенизировали со средой выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис и 1 мМ динатриевой

* - адресат для переписки

ФЕРМЕНТЫ АОЗ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

соли ЭДТА (рН 7,4) в стеклянном гомогенизаторе Поттера–Эльвегейма в соотношении 1:10 (масса:объём). Полученные гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли в пластиковые центрифужные пробирки и центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. Супернатанты переливали в чистые пробирки и с целью получения постмитохондриальной фракции центрифугировали в течение 20 минут при 10000 g. Все этапы фракционирования тканей проводили при 4°C.

В постмитохондриальной фракции печени определяли активность каталазы (КФ 1.11.1.6.) [6], глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9.) [7] и супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1.) [8].

Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури [9].

Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием пакетов прикладных программ Excel и "SPSS Statistics 17,0", с помощью непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Witney. Различия между данными считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты определения активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты в постмитохондриальной фракции печени intactных крыс разного возраста представлены в таблице. Из неё следует, что у 1,5-месячных животных не отличается от таковой у 2-месячных. Однако, у 1,5-месячных крыс активность СОД на 29% ниже, чем у 12-месячных животных.

Таблица. Активность ферментов первой линии антиоксидантной защиты в постмитохондриальной фракции печени intactных крыс.

Фермент	Единица активности	Возраст (мес)		
		1,5	2,0	12,0
СОД	ЕД/ мин мг белка	0,050±0,004 (n=5)	0,054±0,004 (n=5)	0,070±0,010** (n=5)
ГПО	мкмоль/ мин мг белка	0,12±0,03 (n=9)	0,11±0,03 (n=6)	0,12±0,04 (n=5)
Каталаза	мкмоль/ мин мг белка	117±10 (n=8)	286±23** (n=5)	**452 ±34 (n=5)

Примечание: Результаты представлены в виде средней величины ± ошибка средней;

** - $p < 0,05$ к 1,5 месячным животным. В скобках указано количество животных в каждой серии.

Активность ГПО у крыс всех исследованных возрастных групп находится на одном уровне, а активность каталазы у животных в возрасте от 1,5- до 12-месяцев постепенно повышается. При этом у крыс 2- и 12-месячного возраста она становится на 144% и 286% соответственно выше, чем у 1,5-месячных животных.

Кратковременная иммобилизация 2-месячных крыс сопровождается увеличением активности СОД в постмитохондриальной фракции печени на 30%, по сравнению с её исходным уровнем (рисунок). В тоже время у животных других возрастных групп после 30-минутной иммобилизации активность данного фермента остаётся на исходном уровне. При продолжительной иммобилизации у 2- и 12-месячных крыс происходит повышение активности СОД в постмитохондриальной фракции печени на 62% и 122% соответственно, по сравнению с её исходным уровнем.

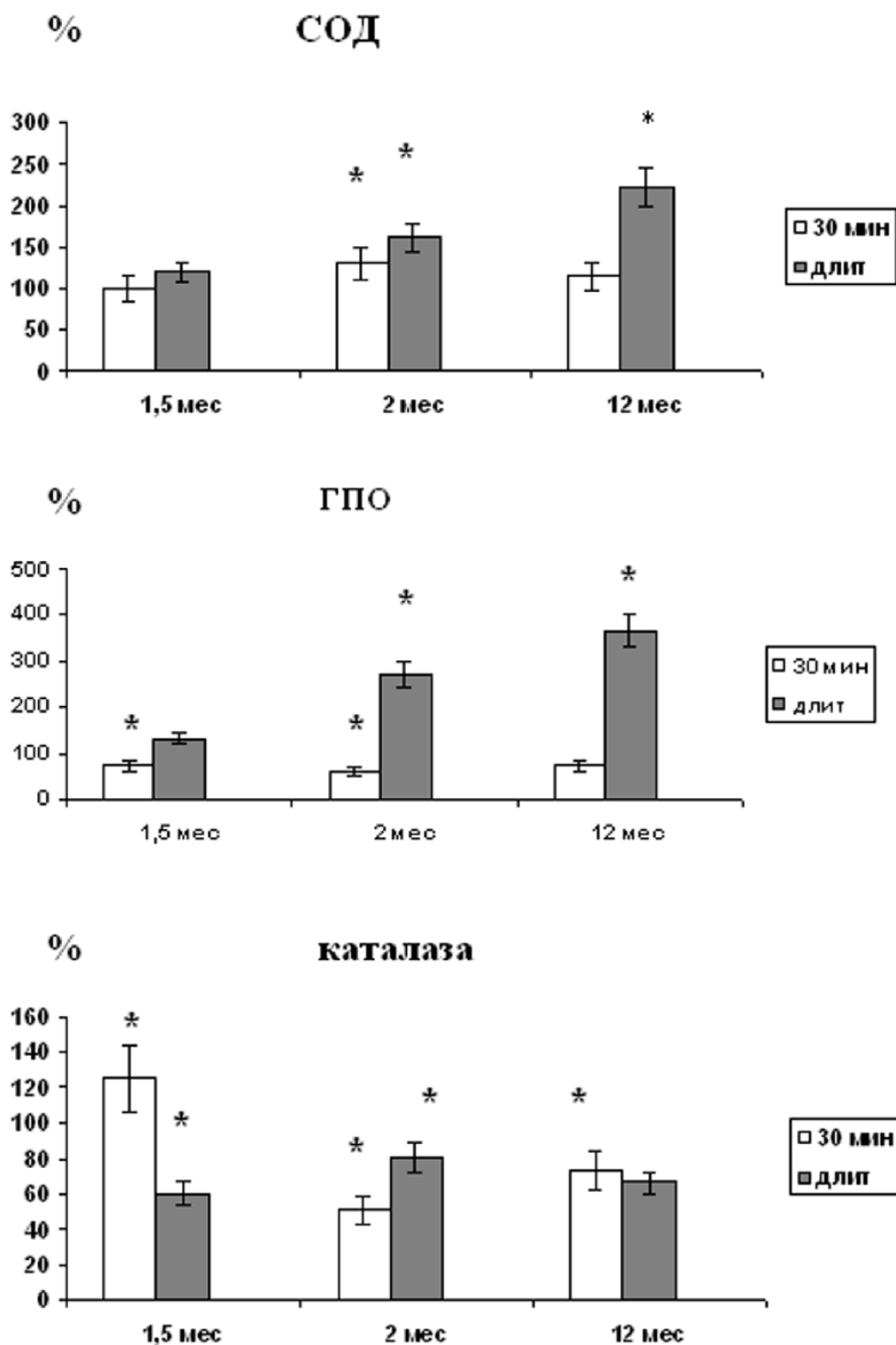


Рисунок.

Изменение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты в постмитохондриальной фракции печени крыс при кратковременном (30 мин) и продолжительном (длит) иммобилизационном стрессе.

Примечание: результаты выражены в процентах изменения активности по отношению к интактным. Активность фермента у интактных животных принята за 100%.

* - $p < 0,05$ к интактным крысам.

Активность ГПО в исследованной субклеточной фракции печени у 1,5- и 2-месячных крыс понижается на 26% и 39% соответственно, по сравнению с таковой у интактных животных соответствующих возрастных групп, тогда как у взрослых крыс кратковременная иммобилизация не сопровождается изменением активности данного фермента. При продолжительной иммобилизации активность ГПО у 2- и 12- месячных крыс повышается на 172% и 267% соответственно, по сравнению с её исходной величиной, а у 1,5-месячных животных не изменяется и остается на исходном уровне.

Активность каталазы постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста, подвергнутых 30-минутной иммобилизации, подвергается разно направленным изменениям. После продолжительной иммобилизации у 1,5- и 2-месячных животных её величина понижается на 40% и 19% соответственно по сравнению с исходной величиной, а у взрослых крыс остается на исходном уровне.

Оценивая представленные выше данные, можно заметить, что активность СОД и каталазы в постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста меньше, чем у взрослых животных. Причиной этого могут быть возрастные особенности в регуляции экспрессии генов СОД и каталазы в гепатоцитах [10, 11]. Уменьшение активности данных энзимов предполагает ограничение мощности ферментативной системы первой линии антиоксидантной защиты в цитозоле клеток печени крыс на этапе полового созревания. Это, в свою очередь, способствует повышению чувствительности гепатоцитов к свободнорадикальному повреждению при стрессе. Вместе с тем, нельзя исключить также и возможности модуляции ферментативной системы первой линии антиоксидантной защиты в условиях стресса. Для проверки этого предположения было проведено изучение активности СОД, ГПО и каталазы при иммобилизации животных.

Исследования показали, что иммобилизационный стресс действительно влияет на активность изученных ферментов. Направленность этого влияния зависит от возраста животных и продолжительности стрессорного воздействия.

При кратковременной иммобилизации в постмитохондриальной фракции печени возникают разно направленные сдвиги в активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты. В меньшей мере при 30-минутной иммобилизации изменение активности энзимов проявляется у 12-месячных животных. При этом у крыс пубертатного возраста в разной мере понижается активность каталазы и ГПО. Подобный сдвиг может способствовать понижению эффективности функционирования ферментативной системы первой линии антиоксидантной защиты в печени при остром стрессорном воздействии у крыс в возрасте полового созревания. Причиной понижения активности каталазы и СОД может быть прямой ингибирующий эффект накапливающихся в клетках печени при стрессе активных форм кислорода и карбонильных продуктов свободнорадикального окисления [12, 13].

В условиях продолжительной иммобилизации происходит повышение активности СОД и ГПО в постмитохондриальной фракции печени 2- и 12-месячных крыс, что, однако, не характерно для 1,5-месячных животных. Активация СОД и ГПО, по всей вероятности, имеет адаптивное значение, направленное на усиление антиоксидантной защиты гепатоцитов в условиях хронического воздействия прооксидантных факторов стресса. В её основе может лежать стрессорная стимуляция экспрессии генов данных энзимов.

Следует заметить, что сопровождающее активацию СОД и ГПО понижение активности каталазы у 2-месячных животных, очевидно, не оказывает существенного влияния на эффективность функционирования первой линии антиоксидантной защиты в цитозоле гепатоцитов. Оно может отражать возрастное ограничение роли данного фермента в антиоксидантной защите гепатоцитов в условиях продолжительного стрессорного воздействия.

Полученные данные указывают на то, что в пубертатном возрасте формируются предпосылки для понижения эффективности функционирования ферментативной системы первой линии антиоксидантной защиты в цитозоле гепатоцитов в условиях острого стрессорного воздействия, что предполагает повышение чувствительности печени к действию повреждающих факторов стресса. В условиях продолжительного иммобилизационного стресса, в постмитохондриальной фракции печени взрослых крыс и животных в возрасте позднего пубертата формируются адаптивные сдвиги со стороны активности СОД и ГПО, которые могут способствовать повышению эффективности антиоксидантной защиты клеток печени и ограничению их чувствительности к стрессу, что не характерно для крыс раннего пубертатного возраста.

Всё это свидетельствует о том, что печень крыс раннего пубертатного возраста проявляет большую чувствительность к стрессу, чем у животных в возрасте позднего пубертата. Причиной данных различий могут быть возрастные особенности в гормональной регуляции метаболизма на разных стадиях полового созревания. Их выяснение требует специального изучения, чему и будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста, в большей мере у 1,5-месячных животных, снижена активность СОД и каталазы, по сравнению с её величиной у взрослых животных.

В условиях кратковременной иммобилизации в постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста происходит уменьшение активности каталазы и ГПО, которое предопределяет понижение у них эффективности функционирования ферментативной системы первой линии антиоксидантной защиты. Активации ГПО и СОД в постмитохондриальной фракции печени крыс при продолжительной иммобилизации в позднем пубертатном возрасте и у взрослых животных, способствует формированию условий для повышения эффективности функционирования ферментативной системы первой линии антиоксидантной защиты, что не характерно для животных раннего пубертатного возраста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toledo-Rodriguez M., Sandi C. (2007) Neural Plast., **2007**, 71203.
2. Давыдов В.В., Захарченка И.В., Овсянников В.Г. (2004) Бюлл. Эксп. Биол. Мед., **137**, 160-163.
3. Мурадян Ф.Х., Утко Н.А., Мозжухина Т.Г. и др (2003) Укр. Биох. ж. **75**(2), 33-37.
4. Hinerfeld D., Traini M.D., Weinberger R.P. et al. (2004) J. Neurochem., **88**(3), 657-667.
5. Голубев А.Г. (1989) Успехи совр. биологии, **108**(3), 414-429.
6. Барабой В.А., Орел В.С., Карнаух И.М. (1991) Перекисное окисление липидов и радиация, Киев: Наукова Думка.
7. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Ковалевская А.Л. и др. (1981) Доклады АН СССР, **261**(6), 1461-1470.
8. Костюк В.А. (1990) Вопр. мед. химии, **36**(2), 28-35.
9. Lowry O.H., Rosenbrough K.J., Farr A.L., Randall K.I. (1955) J. Biol. Chem., **193**, 265-267.
10. Pereira B., Rosa L.F., Safi D.A. et al. (1994) J. Endocrinol., **140**(1), 73.
11. Williams M.D., Remmem H.V., Conrad C.C. et al. (1998) J. Biol. Chem. **273**(43), 28510-28515.
12. Warner H.R. (1994) Free Radical. Biol. Med., **17**, 249-258.
13. Mari M., Cederbaum A.I. (2001) Hepatology, **33**(3), 652-661.

Поступила: 19. 11. 2009.

**THE ACTIVITY OF THE FIRST LINE ENZYMES OF THE ANTIOXIDANT DEFENCE
IN THE LIVER OF PUBERTAL RATS DURING STRESS**

Y.V. Volkova, L.L. Sukhova, V.V. Davydov, A.V. Goloborodko

Institute of children and adolescents health care of the Academy of Medical Science of Ukraine,
pr. 50-let VLKSM, 52-a, Kharkiv, 61153 Ukraine; e-mail: vaddavydov@mail.ru, iozdp@ukrpost.ua

The purpose of the work was to study the activity of the first line antioxidant defence enzymes in postmitochondrial fraction of liver of pubertal rats during immobilization stress. During short-term immobilization the activity of catalase and glutathione peroxidase (GPx) decreased. Long-term immobilization was accompanied by activation of GPx and superoxide dismutase in the liver postmitochondrial fraction of late pubertal and adult animals, but not early pubertal rats.

Key words: puberty, stress, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, liver.