

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОСОМАЛЬНОЙ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНДУКЦИИ ФЕНОБАРБИТАЛОМ НА ФОНЕ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА.

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 крысам фенobarбитала на вторые сутки экспериментального панкреатита, активности изоформ CYP2B1 и CYP2C6 были значительно выше на четвертые сутки заболевания, чем у ложноперитонизированных контрольных животных.

Активность исследуемых форм цитохрома P450 на десятый день острого панкреатита (спустя трое суток после отмены индукции) была ниже, чем у контрольных животных.

Таким образом, при остром панкреатите у крыс усиливается «способность» печеночных монооксигеназ к индукции фенobarбиталом. При этом «выход» из индукции (снижение активности ферментов после отмены индуктора) у больных животных происходит быстрее, чем у контрольных.

Ключевые слова: острый панкреатит, цитохром P450, индукция, фенobarбитал.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема острого панкреатита является одной из актуальных тем современной гастроэнтерологии, поскольку среди острых хирургических заболеваний органов брюшной полости панкреатит занимает третье место по частоте встречаемости [1]. У большинства больных с острым панкреатитом происходит снижение белоксинтезирующей и детоксикационной функции печени, связанное с дистрофическими изменениями в гепатоцитах, что осложняет течение заболевания и его лечение [2]. Поэтому представляется актуальным изучение при этой патологии активности ферментов микросомальной монооксигеназной системы (МОС), ответственной за большинство реакций детоксикации в организме. Ключевым ферментом этой системы является цитохром P450, который метаболизирует широкий спектр соединений как экзогенного, так и эндогенного происхождения [3,4]. Важной адаптивной реакцией МОС в ответ на экспозицию чужеродных химических соединений является индукция ферментов. Фенobarбитал, будучи лекарственным препаратом, вызывает выраженную индукцию CYP2B1 и CYP2C6, многократно усиливая их активность [5]. Активность изоформ этого фермента при остром панкреатите остается неизученной.

В настоящей работе была исследована индуцибельность цитохромов P450 2B1 и 2C6 на модели животных с острым панкреатитом при введении им фенobarбитала, а также определена их активность на десятые сутки заболевания.

МЕТОДИКА. В экспериментах использовали крыс-самцов породы Вистар весом 200 г. Экспериментальный острый панкреатит моделировали, путем интраоперационной травматизации поджелудочной железы без нарушения ее серозного покрова [6]. Индукцию микросомальных ферментов вызывали ежедневным внутрибрюшинным введением фенobarбитала в дозе 80 мг/кг веса в течение двух или четырех дней.

Животные были разделены на четыре экспериментальных группы. Первую группу составили животные, у которых длительность острого экспериментального панкреатита составила четверо суток. Контролем служили ложнооперированные крысы, забитые на четвертые сутки.

Вторую группу составили животные, которым вводился двукратно фенобарбитал через 48 после создания острого экспериментального панкреатита. Животных забивали спустя 48 часов с момента введения индуктора. Контролем служили ложнооперированные крысы индуцированные аналогично.

Третью группу составили животные, которым была создана модель десятисуточного панкреатита. Контроль - ложнооперированные крысы.

В четвертой группе на фоне двухсуточного панкреатита животным вводили четырехкратно фенобарбитал, забой проводился через 10 суток. Контролем служили ложнооперированные индуцированные в те же сроки животные.

Микросомальная фракция печени была получена традиционным методом дифференциального центрифугирования. Содержание цитохромов P450 и b₅ определяли спектрофотометрическим методом Омура и Сато [7], содержание белка - по методу Лоури [8]. Активность изоформ цитохрома P450 определяли в метаболизме ряда алкоксирезорифинов по методу Бурке и Майера [9]. Статистическую обработку результатов проводили по программе STATGRAPHICS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящей работе исследовалась активность и индуцибельность таких форм цитохрома P450, как CYP2B1 CYP2C6 в печени крыс с острым панкреатитом, получавших фенобарбитал. В качестве специфических реакций, в которых участвуют исследуемые изоформы цитохрома P450, были использованы бензилоксирезорифин-О-деалкилаза (БРОД), пентоксирезорифин-О-деалкилаза (ПРОД), а так же этоксирезорифин-О-деалкилаза (ЭРОД) и метоксирезорифин-О-деалкилаза (МРОД). Для этого была использована модель четырехсуточного острого панкреатита, так как морфологические исследования показали, что именно в эти сроки у животных наблюдается наиболее ярко выраженная картина этого заболевания, коррелирующая с изменениями активности ферментов печени и поджелудочной железы [2].

У животных при остром четырехсуточном панкреатите наблюдается снижение метаболической активности цитохрома P450 (таблица 1): 2C6 - БРОД на 53% (P<0,01), 2B1 - ПРОД на 67% (P<0,01), 1A1-7-ЭРОД на 58% (P<0,01), 1A2-7-МРОД на 31% (P<0,01), при этом общее количество цитохрома P450 и b₅ определяемых спектрально, существенно не изменялось. Таким образом, острый экспериментальный панкреатит, развивающийся в течение четырех суток, приводит к снижению конститутивной активности ряда ферментов МОС, что может быть одной из причин снижения детоксикационной функции печени при этом заболевании.

Таблица 1. Характеристика МОС печени крыс при остром четырехсуточном панкреатите.

Группы животных	Время течения панкреатита, сутки	Содержание цитохрома b ₅ пкмоль/мг белка	Содержание цитохрома P450 пкмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пкмоль резорифина в мин/мг белка)			
				ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
панкреатит	4	682±3,0	1380±23	12,4±0,81**	48,16±2,15**	2,83±0,11**	0,682±0,03**
контроль	-	744±14	2150±145	29,4±0,91	69,93±6,35	6,36±0,98	0,744±0,14

Примечания.* P<0,05, ** P<0,01 по сравнению с контролем

Одной из основных характеристик цитохрома Р450 является индукция его изоформ под воздействием различных ксенобиотиков, в частности, барбитуратов и других лекарственных веществ. Поэтому представлялось важным сравнить индуцибельность некоторых изоформ на модели острого панкреатита и «ложной» операции при введении животным индуктора цитохромов Р450. У больных острым панкреатитом крыс (как и у ложноперированных) введение фенобарбитала сопровождалось почти двухкратным увеличением содержания цитохрома Р450, тогда как содержание b_5 существенно не изменялось (табл. 2). Наряду с увеличением общего количества Р450 отмечено и увеличение специфических активностей исследуемых изоформ. У индуцированных ложноперированных животных на четвертые сутки отмечено, что индекс индукции (увеличение активности по сравнению с контролем) для БРОД составлял 28,8, для ПРОД - 33,4, а для ЭРОД - 1,2. Отмечено снижение МРОД в 2,4 раза в сравнении с неиндуцированными животными. Следует заметить, что фенобарбитал не оказывает существенного влияния на активности CYP1A1 и CYP1A2, о чем свидетельствуют относительно низкие активности ЭРОД и МРОД. Его индуцирующий эффект, как описано ранее [5], проявляется для цитохромов Р450 семейства 2, а именно CYP2B1 и CYP2C6. При индукции животных с острым двухсуточным панкреатитом отмечается увеличение БРОД в 89,2 раз, ПРОД - в 166 раз, ЭРОД - в 3,9 раз, МРОД - в 1,86 раз в сравнении с неиндуцированными больными животными.

Таблица 2. Активность ферментов МОС при остром экспериментальном 4-х суточном панкреатите крыс, обработанных 2-х кратно фенобарбиталом.

Группы животных	Время течения панкреатита, сутки	Время экспозиции индуктора, сутки	Содержание цитохрома b_5 пкмоль/мг белка	Содержание цитохрома Р450 пкмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пкмоль резорфуфина в мин/мг белка)			
					ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
панкреатит	4	2	690±16	2429±41	48,4±3,5**	88,9±7,4**	262,5±8,4*	354,1±25,9**
контроль	-	2	486±8,3	1950±42	33,9±2,8	34,9±10,2	171,9±72,2	212,25±32,2

Примечания. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Сравнивая эффект действия фенобарбитала на здоровых и больных животных, можно отметить, что у последних индуцирующий эффект существенно выше, как и абсолютные значения исследуемых активностей (табл. 2). Так, в печени индуцированных страдающих панкреатитом крыс абсолютные значения активности БРОД были выше на 47% ($P < 0,05$), ПРОД на 67% ($P < 0,01$), ЭРОД на 42% ($P < 0,01$), МРОД на 154% ($P < 0,01$), по сравнению с ложноперированными индуцированными животными.

Многими исследователями при остром панкреатите у лабораторных животных на 7-12 сутки отмечено возвращение к исходному уровню ряда ферментов (в частности, моноаминоксидаз), серотонина, фосфолипидов, ацетилхолина [10,11]; сообщалось о репаративных процессах в поджелудочной железе [12] в те же сроки. В связи с этим были исследованы активности изоформ Р450 спустя 10 суток с момента заболевания животных острым панкреатитом (таблица 3). Общее количество цитохромов Р450 и b_5 к этому сроку оставалось практически на контрольном уровне, как при двух-, так и четырехсуточном панкреатите. Активность исследуемых изоформ в отношении метаболизма специфических субстратов, сниженная в остром периоде течения панкреатита, на десятые сутки несколько повысилась, однако не достигла контрольных цифр, наблюдаемых у ложноперированных животных. БРОД была снижена на 56% ($P < 0,05$), ПРОД - на 19% (статистической достоверности не получено), ЭРОД - на 55% ($P < 0,05$), МРОД - на 13% ($P < 0,05$).

Для изучения отдаленного действия фенобарбитала на МОС печени при остром панкреатите проведено изучение активности изоформ цитохрома Р450 у животных с патологией поджелудочной железы, получавших фенобарбитал в течение четырех суток, начиная с третьего дня заболевания острым панкреатитом. Активность ферментов была исследована на десятые сутки после заболевания крыс острым панкреатитом, т.е. на четвертые сутки после последнего введения индуктора. Данные этого эксперимента приведены в таблице 4. Сравнивая эти результаты с данными таблицы 2, можно видеть, что через четверо суток после отмены приема фенобарбитала у ложноперитонизированных животных происходит значительное снижение активности БРОД и ПРОД (в 4,2 и 12,5 раз, соответственно), но не до контрольного уровня (сравнить с табл. 3). Эффект индукции на ЭРОД и МРОД в данной экспериментальной группе сохранялся.

Таблица 3. Характеристика МОС печени крыс при экспериментальном остром панкреатите на 10 сутки заболевания.

Группы животных	Время течения панкреатита, сутки	Содержание цитохрома b5 пкмоль/мг белка	Содержание цитохрома Р450 пкмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пкмоль резорфуфина в мин/мг белка)			
				ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
панкреатит	10	544±65,4	740±12,1	3,17±0,6*	18,33±0,4*	5,96±2,5*	2,4±1,6
контроль	-	580±20,0	940±3,4	6,80±0,2	21,0±1,2	13,6±0,4	3,0±0,9

Примечания.* P<0,05 ** P<0,01.

У индуцированных крыс, больных панкреатитом, отдаленное влияние фенобарбитала несколько отличалось от описанного выше (ср. таблицы 2 и 3). Скорость биотрансформации бензилоксирезорфуфина и пентоксирезорфуфина снижается к 10 суткам заболевания быстрее, чем у ложноперитонизированных животных (в 8,4 раза и 42,6 раза, соответственно), однако, в отличие от контрольных крыс, происходит снижение скорости реакции, обусловленное ЭРОД и МРОД (в 2 и 3,6 раз, соответственно). Следует отметить, что абсолютные значения исследуемых активностей остаются выше, чем у неиндуцированных больных крыс на десятые сутки после моделирования острого панкреатита (ср. таблицы 3 и 4).

Таблица 4. Активность ферментов МОС при остром 10-ти дневном панкреатите спустя четверо суток после введения фенобарбитала.

Группы животных	Время течения панкреатита, сутки	Время экспозиции индуктора, сутки	Содержание цитохрома b5 пкмоль/мг белка	Содержание цитохрома Р450 пкмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пкмоль резорфуфина в мин/мг белка)			
					ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
панкреатит	10	4	690±28	965±34	24,44±3,0*	24,28±3,8**	31,0±12,9	8,3±4,17**
контроль	-	4	755±36	910±37	37,9±8,4	33,39±3,2	40,66±23,1	16,92±1,89**

Примечания.* P<0,05 ** P<0,01.

Таким образом, угнетение конститутивной активности при остром панкреатите может снижать метаболизм лекарственных препаратов, используемых для его лечения. Этот факт может предполагать необходимость стимуляции ферментов МОС и, следовательно, применение индукторов при этой патологии.

Фенобарбитал, являясь лекарственным препаратом, с одной стороны, стимулирует активность монооксигеназ, с другой - обеспечивает достаточно быстрый возврат их индуцированной активности к исходному уровню. Все это может говорить о том, что фенобарбитал, увеличивая эффект индукции ферментов при остром панкреатите, может влиять на фармакокинетику лекарственных препаратов, используемых в терапии этого заболевания. В любом случае, при остром панкреатите необходима коррекция ферментов МОС, которая может предполагать применение фенобарбитала в терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельев В.С. (1983), Острый панкреатит, М.: Медицина.
2. Мичурин В. Ф. (1972), Клинич. хирургия, 6, 18-22.
3. Арчаков А.И. (1985), Микросомальное окисление, М: Наука.
4. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. (1978), Структурные аспекты биохимии монооксигеназ, Новосибирск: Наука (Сибирское отделение), 238с.
5. Waxman D.J., Azaroff L. (1992), Biochem. J., 281, 577-592.
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.
10. Терещенко В.Ю. (1976), Казанский мед. журн., 2, 184-185.
11. Карагезян К.Т., Симаворян П.С., Овакимян С.С, Бюлл. экспер. биол. и мед. (1975), N7, 45-49.
12. Дюбенко К. А. (1981), Вестник АН УССР, Киев, 11, 30-31.

Поступила 29.04.99.

THE CHANGES IN MICROSOMAL MONOOXYGENASE SYSTEM OF RAT LIVER AT ACUTE PANCREATITIS DURING PHENOBARBITAL INDUCTION

N. V. PROKOPIEVA, L. F. GULYAEVA, N. E. POLYAKOVA.

Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of the Medical Science, Timakov St.2, Novosibirsk, 630117, Russia, e-mail: Gulyaeva@cyber.ma.nsc.ru

While injecting phenobarbital (PB) into the rats, on the second day of an experimental pancreatitis, cytochrome P450 2B1 and 2C6 activities were found, on the forth day of disease, as being considerably higher in comparison with data obtained in sham - operated control animals.

On the tenth day of the acute pancreatitis (in three days upon having the induction canceled), activity of the cytochrome P450 isozymes was lower than that of control animals.

Thus, the rats with acute pancreatitis, are characterized by an increased inducibility of liver monooxygenases. In addition, a release from induction (decrease of these activities upon having the induction canceled) proceeds faster than that in control animals.

Key words: acute pancreatitis, cytochrome P450, induction, phenobarbital.