

УДК 612.354.2.085:577.152.1:613.863+612.67

©.Н.П. Рудько, В.В. Давыдов.

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ РЕДУКТАЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

Н.П. РУДЬКО, В.В. ДАВЫДОВ.

Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

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

В работе проведено изучение влияния 0,01% додецилсульфата натрия, 1,5 М и 6 М мочевины и 0,03 М перекиси водорода на НАД(Ф)Н: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазную активность микросом печени взрослых и старых крыс в норме и при иммобилизационном стрессе. Исследования показали, что у интактных животных обеих возрастных групп додецилсульфат натрия, перекись водорода и мочевина не оказывают существенного влияния на активность НАДФН-зависимой редуктазы микросом печени, но изменяют активность НАДН-зависимого энзима. У старых крыс регуляторное действие изученных веществ на НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазную активность микросом выражено в значительно меньшей мере, чем у взрослых. Сдвиг аналогичной направленности возникает у взрослых животных при стрессе. Иммобилизация старых крыс сопровождается уменьшением базальной НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазной активности микросом печени и ограничением влияния на нее додецилсульфата натрия, перекиси водорода и мочевины. Высказывается предположение о том, что дополнительное уменьшение НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазной активности создает предпосылки для большего ограничения скорости гидроксирования субстратов в микросомах печени старых крыс при стрессе по сравнению со взрослыми животными.

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

**ВВЕДЕНИЕ.** Старение сопровождается снижением устойчивости организма к действию повреждающих факторов стресса [1, 2]. Важное значение в этом может иметь возрастное изменение функции печени [3, 4]. Многочисленными исследованиями было показано, что при старении происходит нарушение окислительно-восстановительных процессов в микросомальных гидроксилазных цепях [4-7], которые по всей вероятности и определяют

нарушение функции данного органа. Однако до настоящего времени не существует ясных представлений о роли стресса в формировании возрастных сдвигов в антиоксидантной функции печени при старении. Изучение данного вопроса открывает широкие перспективы в разработке новых подходов к лечению и профилактике патологии печени в пожилом возрасте.

Учитывая, что в литературе отсутствуют систематизированные сведения о состоянии начальных компонентов микросомальных редокс цепей при стрессе на поздних этапах онтогенеза, целью работы явилось изучение некоторых особенностей регуляции активности НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктаз в печени взрослых и старых крыс при стрессе.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали 40 крыс линии Вистар самцов двух возрастов: взрослые (10 - 12 мес.) и старые (22 - 25 мес.). Животных обеих групп, в свою очередь, делили 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].

Животных декапитировали. Печень извлекали и отмывали от крови. Навески печени использовали для приготовления 10% гомогенатов на 1,15% 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 суспензировали с 1 мл 1,15% KCl и использовали в качестве грубой микросомальной фракции. Все процедуры после декапитации проводили при 2 - 4 °C.

В суспензии грубой микросомальной фракции определяли активность НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктаз [9]. В среду инкубации микросом дополнительно вносили модуляторы активности редуктаз: 0,01% додецилсульфат натрия, 1,5 и 6 М мочевины, а также 0,03 М перекись водорода (конечные концентрации). Содержание белка в пробах измеряли по Лоури.

Полученные данные подвергались статистической обработке по методу Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Исследования показали, что у старых крыс происходило уменьшение активирующего влияния додецилсульфата натрия на 17%, исчезновение ингибирующего эффекта перекиси водорода и снижение ингибирующего эффекта 1,5 М мочевины на 47% на НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазную активность микросом по сравнению со взрослыми животными (табл.1).

При стрессе у взрослых крыс выявлялось выраженное снижение эффекта исследованных веществ на НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазную активность микросом по сравнению с интактными животными. Так, величина активирующего влияния додецилсульфата натрия уменьшалась у них на 26%, а ингибирующего действия перекиси водорода и 1,5 М мочевины снижалась на 62% и 59% соответственно по сравнению с интактными. У старых крыс при стрессе определялась лишь незначительная тенденция к появлению сдвигов аналогичной направленности.

Использованные модуляторы активности редуктаз обладали существенными особенностями в отношении их влияния на НАДФН: 2,6-

дихлорфенолиндофенолредуктазную активность микросом печени (табл.2). Так, у взрослых животных не выявлялось ингибирующего действия 1,5 М мочевины на данный фермент, а перекись водорода способствовала лишь возникновению тенденции к снижению активности на 19 % по сравнению с ее базальным уровнем. У старых крыс додецилсульфат натрия, перекись водорода и 1,5 М мочевина не оказывали существенного влияния на НАДФН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазную активность печени.

Таблица 1. Влияние некоторых модуляторов на НАДН:2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазную активность микросом печени взрослых и старых крыс при стрессе ( $X \pm m$ ;  $n = 5 - 6$ ).

Модулятор	Взрослые		Старые	
	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс
-	190 $\pm$ 17	119 $\pm$ 5 *	105 $\pm$ 8 **	87 $\pm$ 4
Додецилсульфат натрия (0,01%)	292 $\pm$ 30	167 $\pm$ 12 *	152 $\pm$ 11 **	106 $\pm$ 18
Перекись водорода (0,03 М)	141 $\pm$ 12	107 $\pm$ 8 *	105 $\pm$ 8 **	82 $\pm$ 5
Мочевина (6 М)	31 $\pm$ 4	23 $\pm$ 3 *	21 $\pm$ 2 **	25 $\pm$ 1
Мочевина (1,5 М)	145 $\pm$ 13	102 $\pm$ 9 *	86 $\pm$ 8 **	73 $\pm$ 5

Примечание: Активность фермента выражена в мкмоль/мин на мг белка. \* -  $P < 0,05$  к интактным; \*\* -  $P < 0,05$  к взрослым интактным.

Таблица 2. Влияние некоторых модуляторов на НАДФН:2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазную активность микросом печени взрослых и старых крыс при стрессе ( $X \pm m$ ;  $n = 5 - 6$ ).

Модулятор	Взрослые		Старые	
	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс
-	16 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	**9 $\pm$ 1	*5 $\pm$ 1
Додецилсульфат натрия (0,01%)	22 $\pm$ 3	19 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1
Перекись водорода (0,03 М)	13 $\pm$ 1	16 $\pm$ 3	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
Мочевина (1,5 М)	14 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2

Примечание: то же, что и в таблице 1.

Проведенные исследования показали, что НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазная активность микросом печени взрослых животных изменяется под влиянием додецилсульфата натрия, перекиси водорода и мочевины, что соответствует имеющимся литературным данным [10]. НАДФН - зависимый фермент при этом проявляет значительную устойчивость к действию изученных модуляторов.

У старых животных выявляется значительное снижение чувствительности НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазной активности к эффекту всех исследованных веществ.

Оценивая возможный механизм влияния додецилсульфата натрия и перекиси водорода на активность данного фермента можно предположить его взаимосвязь с модификацией структуры липидного бислоя микросомальной мембраны под влиянием этих соединений. Ингибирующий эффект мочевины на НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазу, по всей вероятности, обусловлен денатурирующим влиянием последней на молекулу фермента.

Характерно, что сдвиги, связанные с изменением свойств гидрофобного слоя мембран и нативности полипептидных цепей белков, формируются в клетках в процессе их старения. Согласно имеющимся данным при старении происходит изменение физико-химических свойств гидрофобного слоя внутриклеточных мембранных структур [11, 12], модификация мембранных белков [13, 14] и нарушение процесса их биосинтеза [15]. Все эти сдвиги могут быть обусловлены стимуляцией свободно-радикальных процессов в клетках [16, 17].

При стрессе у взрослых животных в печени происходит изменение особенностей регуляции НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазной активности микросом, аналогичное таковому при старении. По всей вероятности это определяется тем, что характер большинства возникающих при старении метаболических сдвигов имеет ту же направленность, что и при стрессе. В этой связи В.В.Фролькисом была сформулирована концепция о «стресс-возраст-синдроме» [18].

Согласно современным представлениям одним из центральных звеньев патогенеза стрессорного повреждения тканей является стимуляция в них свободно-радикальных процессов [19]. Их проявлением служит интенсификация процесса окисления мембранных белков, усиление перекисного окисления липидов и накопление в мембранах свободных жирных кислот, которые ввиду присущего им детергентного действия изменяют физические свойства липидного бислоя. Подобно тому, как это происходит при старении, формирующиеся при стрессе сдвиги способствуют уменьшению действия изученных нами модуляторов на НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазную активность в печени.

При иммобилизационном стрессе у старых крыс происходит резкое снижение влияния додецилсульфата натрия, перекиси водорода и мочевины на НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазную активность. По всей вероятности, это связано с тем, что мембраны микросом печени старых крыс имеют более высокий базальный уровень окислительной модификации липидного и белкового компонентов, чем у взрослых животных. При стрессе величина повреждения мембранных компонентов еще более усиливается. За счет этого у старых крыс, подвергнутых стрессу, уменьшается влияние додецилсульфата натрия, перекиси водорода и мочевины, участвующих в формировании сдвигов, возникающих в клетке при стимуляции свободно-радикальных процессов, на активность микросомальных редуктаз. Таким образом, выявленное нами ограничение модулирующего эффекта изученных веществ на НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенолредуктазную активность в печени старых крыс при стрессе, по всей вероятности, отражает больший уровень повреждения фермента или изменения структуры микросомальной мембраны. Подтверждением этого является и уменьшение активности этого фермента в микросомах печени крыс данной группы на 26% по сравнению с его величиной у взрослых животных.

Дополнительное ингибирование НАДН: 2,6-дихлорфенолиндофенол редуктазной активности формирует определенные предпосылки для усиления нарушения окислительно-восстановительных процессов в оксигеназных цепях митохондрий и, как следствие этого, угнетение антитоксической функции печени у старых крыс при стрессе.

Особое значение в данной ситуации имеет уменьшение активности НАДН-зависимой редуктазы. Это связано с тем, что в условиях дефицита восстановленного НАДФ в тканях при старении [20] (ввиду существования тесной взаимосвязи между оксигеназными и редуктазными редокс цепями митохондрий) значительно возрастает роль восстановленного НАД в обеспечении процесса гидроксилирования субстратов в печени [21]. Однако данное предположение требует тщательной экспериментальной проверки, что и будет составлять предмет наших дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Чеботарев Д.В., Коркушко О.В. (1977). Тер.Архив., 2, 121 – 126.
2. Lakkata E.G. (1980). Fed.Proc., 39, 41, 314 – 317.
3. Durnas C., Loi C.M., Cusack B.J. (1990). Clin.Pharmacokinet., 19, 358– 389.
4. Woodhouse K., Wynne H.A. (1992). Drug.Aging., 2, 243 – 255.
5. Horbach G.J., Van Asten J.G., Rietjens I.M., et al. (1992). Xenobiotica, 22, 512 – 522.
6. Plewka A., Kaminski M., Plewka D. (1998). Mech. Ageing. Dev., 105, 197 – 207.
7. Friedman F.K., Robinson R.C., Rifkind J. (1988). Biochem. Biophys. Res. Commun., 158, 480 – 484.
8. Швець В.Н., Давыдов В.В. (1992). Биохимия стресса и пути повышения эффективности лечения заболеваний стрессорной природы. Материалы всеукраинского симпозиума с международным участием. Запорожье, 64 – 67.
9. Карузина И.И., Арчаков А.И. (1977). Современные методы в биохимии. М.: Медицина, с. 49 – 62.
10. Пентюк А.А. (1989). Укр.биохим.журн., 61, 87 – 93.
11. Miyazawa T., Suzuki T., Fujimoto K. (1993). Lipids, 28, 789 – 793.
12. Hayashi T., Miyazawa T. (1998). Mech.Ageing.Dev., 100, 231 – 242.
13. Lebel C.P., Bondy S.C. (1991). Int.J.Dev.Neurosci., 9, 139 – 146.
14. Дубинина Е.Е., Шугалей Н.В. (1993). Успехи современной биологии, 113, 71 – 81.
15. Blazejowski C.A., Webster G.C. (1983). Mech.Ageing.Dev., 21, 345 – 356.
16. Cutler R.G. (1985). Mol.Biol. Aging.Proc. (London ), N5, 15 – 201.
17. Gille I.I.P. (1990). Pharm. Urechbl., 125, 523 – 528.
18. Фролькис В.В. (1991). Физиологический журнал, 37, 3 – 11.

19. *Меерсон Ф.З.* (1984). Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических поражений сердца. – М.: Медицина. – 270 с.
20. *Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Калиман П.А.* (1983). Укр. биохим. журн., **55**, 523 – 528.
21. *Карякин А.В., Арчаков А.И.* (1985). Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии, **5**, 38 – 81.

Поступила 13.09.00.

### PECULIARITY OF THE LIVER MICROSOMAL REDUCTASE ACTIVITY REGULATION IN THE 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 influence of 0.01% sodium dodecyl sulphate, 1.5 and 6.0 M urea and 0.03 M hydrogen peroxide to the NAD(P)H: 2,6 dichlorphenolindophenol reductase activity in livers of adult and old Wistar rats during immobilizing stress was interested.

Obtained results indicate that the NADPH - dependent reductase is more resistant to modulating effect of sodium dodecyl sulphate, hydrogen peroxide and urea than NADH-dependent enzyme. The significant decrease of NADH: 2.6 dichlorphenolindophenol reductase sensitivity to the action of all studied modulators occurs in old rats. The similar changes appears in the adult rats liver during stress. The old rats immobilization is accompanied by a decrease of this enzyme activity and the reduction of the influence of all studied modulators to NADH: 2.6 dichlorphenolindophenol reductase as compared with adult ones. These changes in the activity and properties of microsomal NADH: 2,6 dichlorphenolindophenol reductase promote more pronounced decrease of the substrate hydroxylation in the liver of old rats during stress compared to adult ones.

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