

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.142.1

@Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ АРОХЛОРА 1254 НА МИКРОСОМАЛЬНУЮ МОНООКСИГЕНАЗНУЮ СИСТЕМУ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ.

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

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

При остром панкреатите снижение конститутивной активности цитохромов P450 1A1, 1A2, 2C6 и 2B1 в печени крыс сохраняется на десятки суток заболевания. Активность этих изоформ при однократном введении Арохлора 1254 на вторые сутки заболевания остается увеличенной к десятым суткам течения панкреатита, хотя намечается тенденция возвращения к исходному уровню, как у больных, так и у контрольных животных.

Таким образом, при остром панкреатите наблюдается долговременное угнетение активностей исследуемых монооксигеназ. При индукции Арохлором 1254 активность цитохрома P450 остается высокой в течение 10 дней как у больных, так и здоровых животных, затем наблюдается возвращение к исходному контрольному уровню, причем у первых это происходит быстрее.

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

ВВЕДЕНИЕ. Панкреатит является одной из сложных проблем абдоминальной патологии человека. При этом заболевании ферменты поджелудочной железы и продукты их взаимодействия с различными веществами, циркулирующими в крови (компоненты калликреин-кининовой системы, продукты распада гемоглобина и его производные, полипептиды и др.), оказывают влияние на микроструктуру и функции печени. Печень вовлекается в патологический процесс уже в первые часы, что приводит к ослаблению ее функций, в том числе детоксикационной и белоксинтезирующей [1]. Большинство детоксицирующих реакций в организме человека и млекопитающих осуществляется микросомальной монооксигеназной системой (МОС) печени. Её ключевым ферментом является цитохром P450, который представляет собой мультигенное суперсемейство изоферментов. Одним из важнейших свойств цитохрома P450 является его высокая индуцибельность, то есть увеличение содержания отдельных или целых групп изоферментов при воздействии на организм ряда ксенобиотиков [2]. Среди индукторов особое место занимает Арохлор 1254, который способен значительно усиливать активность многих

ИНДУКЦИЯ АРОХЛОРОМ 1254 ЦИТОХРОМА P450

изоформ P450 [3]. Ранее мы показали, что введение крысам с острым панкреатитом Арохлора 1254 сопровождалось усилением индуцибельности некоторых изоформ цитохрома P450 в первые сутки заболевания. Однако, вопрос о том, как изменяется активность ферментов МОС в более отдаленные сроки течения панкреатита, остается невыясненным. В связи с этим, в настоящей работе определена активность некоторых изоформ цитохрома P450 печени крыс на десятые сутки заболевания острым панкреатитом, а также исследован отдаленный эффект индукции Арохлором 1254 в эти сроки.

МЕТОДИКА. В экспериментах использовали крыс-самцов породы Вистар весом 180 г. Экспериментальный острый панкреатит вызывали, как описано у автора [4], путем интраоперационной травматизации поджелудочной железы без нарушения ее серозного покрова. Индукцию микросомальных ферментов вызывали однократным внутрибрюшинным введением Арохлора 1254, разведенного маслом, в дозе 300 мг/кг веса.

Животные были разделены на три экспериментальных группы.

Первую группу составили животные, у которых экспериментальный острый панкреатит длился 10 суток. Контролем служили ложнооперированные крысы.

Во второй группе животным вводили Арохлор 1254 на вторые сутки заболевания острым панкреатитом; животных забивали спустя 10 суток. В качестве контроля были взяты ложнооперированные и аналогично индуцированные животные.

В третьей группе крысам вводили масло на вторые сутки острого экспериментального панкреатита; животных забивали на десятые сутки заболевания. Контролем служили ложнооперированные, обработанные маслом, животные.

Для морфологической оценки изменений ткани печени и степени выраженности панкреатита участки печени и поджелудочной железы заливали формалином с последующей стандартной проводкой материала и окрашиванием его гематоксилином и эозином.

Микросомальную фракцию печени получали традиционным методом дифференциального центрифугирования. Содержание цитохромов P450 и b5 определяли методом Omura и Sato [5], содержание белка - по методу Lowry [6]. Активность изоформ цитохрома P450 определяли в метаболизме ряда алкоксирезорфуринов по методу Burke и соавторов [7]. Статистическая обработка результатов была проведена по программе STATGRAPHICS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящей работе проведено исследование активности изоформ цитохрома P450 в печени крыс на 10-ые сутки течения острого панкреатита и изучены результаты отдаленного влияния Арохлора 1254 на эти активности.

Для подтверждения истинности патологии поджелудочной железы проведены морфологическое исследование ткани печени и поджелудочной железы у всех экспериментальных животных. На 10-ые сутки после создания на крысах модели острого панкреатита в печени наблюдались явления выраженной гепатодистрофии, а в поджелудочной железе - небольшой интерстициальный панкреатит; у контрольных животных морфологических изменений со стороны исследуемых органов не выявлено.

У больных панкреатитом животных, обработанных маслом, в печени были выявлены признаки выраженной гепатодистрофии, в ткани поджелудочной железы у больных крыс - выраженный деструктивный панкреатит с формирующимся заместительным склерозом паренхимы. В экспериментах с введением индуктора (Арохлора 1254) у крыс с острым панкреатитом в печени наблюдается умеренная гепатодистрофия. В поджелудочной железе были признаки пролиферативного панкреатита с переходом в склероз (данные не приведены).

Таким образом, в серии экспериментов с контрольной операцией в поджелудочной железе морфологически патологии не было выявлено. При

моделировании животным острого панкреатита течение болезни подтверждалось морфологическими изменениями: на десятые сутки заболевания наблюдались явления продуктивного панкреатита с переходом в склероз. Следует отметить, что при введении индуктора репаративные процессы в поджелудочной железе были более выражены.

В связи с тем, что на десятые сутки заболевания при гистологическом исследовании ткани поджелудочной железы отмечаются репаративные процессы, которые согласуются с данными других исследователей [8], в настоящей работе проведено исследование активности некоторых изоформ Р450 в этот период. Как видно из таблицы 1, в группе животных на десятые сутки заболевания отмечается снижение специфической активности изоформ цитохрома Р450 1А1 - 7-этоксирезорифин-О-деалкилазы (ЭРОД) на 55% ($p<0,05$), 1А2 - 7-метоксирезорифин-О-деалкилазы (МРОД) на 13% ($p<0,05$), 2С6 - бензилрезорифин-О-деалкилазы (БРОД) на 56% ($p<0,05$), 2В1-пентоксирезорифин-О-деалкилазы (ПРОД) на 19% (статистической достоверности не получено). В восстановительный период острого экспериментального панкреатита сохраняется достаточно отчетливое снижение конститутивной активности некоторых ферментов МОС - СYP1A1 и СYP2C, которое зарегистрировано и на ранних сроках заболевания. Конститутивная активность СYP1A2 и СYP2B1 снижена незначительно.

Таблица 1. Характеристика МОС печени крыс при экспериментальном остром панкреатите на 10 сутки заболевания.

Группы животных	Время течения панкреатита, сутки	Содержание цитохрома b5 пмоль/мг белка	Содержание цитохрома Р450 пмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пмоль резорифина 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: Здесь и в табл. 2.3, значимость различий с контролем: * $p<0,05$ ** $p<0,01$

Для того, чтобы оценить функциональную способность печени в этот период, были исследованы результаты влияния индуктора при введении его в начале заболевания. Поскольку растворителем для индуктора служило масло, нами были проведены эксперименты по влиянию растворителя на изменение активности изучаемых ферментов (табл. 2). У животных с острым панкреатитом отмечено некоторое увеличение активности изоформ Р450 по сравнению с ложнооперированными крысами: ЭРОД на 45% ($p<0,01$), МРОД на 58% ($p<0,01$), БРОД на 61% ($p<0,01$), ПРОД на 53% ($p<0,01$), причем общее количество цитохрома b5 и Р450 существенно не отличалось от исходного уровня. Т.е. в отдаленные сроки острого панкреатита отмечается некоторый индуцирующий эффект масла.

Таблица 2. Активность ферментов МОС при остром 10-ти дневном панкреатите крыс, обработанных маслом.

Группы животных	Время течения панкреатита, сутки	Содержание цитохрома b5 пмоль/мг белка	Содержание цитохрома Р450 пмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пмоль резорифина в мин/мг белка)			
				ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
панкреатит	10	436±6,9	932±9,3	12,06±1,0**	28,3±1,7**	13,06±1,0**	2,2±0,2**
контроль	-	377±1,1	855±13,7	8,3±0,4	17,9±1,7	8,1±0,9	1,4±0,1

ИНДУКЦИЯ АРОХЛОРОМ 1254 ЦИТОХРОМА P450

В таблице 3 представлены результаты активности изоформ цитохрома P450 при введении животным индуктора - Арохлора 1254. Абсолютные значения исследуемых активностей как у больных, так и у здоровых крыс достоверно не различались, за исключением ЭРОД, где отмечено снижение на 67% ($p < 0,01$) у индуцированных больных панкреатитом крыс по сравнению с контролем. Сравнивая данные таблиц 2 и 3, видно, что как у индуцированных, так и у больных панкреатитом животных через четверо суток после введения индуктора (что соответствует 10 суткам заболевания или ложной операции) эффект индукции сохраняется. У ложнооперированных животных индекс индукцибельности (увеличение активности по сравнению с контролем) равен для ЭРОД - 83, МРОД - 24, БРОД и ПРОД 26 и 11, соответственно. У больных панкреатитом крыс этот индекс для ЭРОД составил 25, для МРОД 13, для БРОД 10, а для ПРОД 8.4. Из этих данных следует, что "выход" из индукции происходит быстрее у больных панкреатитом животных. Общее количество цитохрома P450 к этому времени еще остается высоким, а количество b5 сохраняется на исходном уровне.

Таблица 3. Активность ферментов МОС при остром 10-ти дневном панкреатите у крыс, индуцированных Арохлором 1254.

Группы животных	Время течения панкреатита, сутки	Содержание цитохрома b5 пмоль/мг белка	Содержание цитохрома P450 пмоль/мг белка	О-деалкилазная активность (пмоль резорфуфина в мин/мг белка)			
				ЭРОД	МРОД	БРОД	ПРОД
панкреатит	10	669±6,7	3187±65	302,5±155**	385,8±21,8	132,1±40,0	18,6±7,0
контроль	-	536±9,7	2630±72	696,7±27,8	433,3±32,5	215,0±67,5	16,0±4,5

Таким образом, полученные результаты показывают, что снижение конститутивной активности изоформ цитохрома P450 (1A1, 1A2, 2B1, 2C6) в печени крыс при изучаемой патологии поджелудочной железы сохраняется на 10-ые сутки заболевания. Механизм столь длительной супрессии активности ферментов МОС (в течение десяти дней) остается неизвестным. Активность этих изоформ после введения индуктора остается увеличенной, но с тенденцией более быстрого возвращения к исходному уровню по сравнению с контролем. Выявленные различия в индуцированных активностях ферментов МОС при остром панкреатите также свидетельствуют о том, что эта патология влияет не только на конститутивную активность, но и на индукцибельность изоформ цитохрома P450. Вопрос о механизме изменения их конститутивной активности и индукцибельности при остром панкреатите остается невыясненным. Пока лишь можно предполагать, что одной из причин указанных выше различий могут быть изменения в метаболизме эндогенных соединений (витаминов, гормонов, простагландинов и др.), которые, в свою очередь, могут модулировать систему метаболизма ксенобиотиков в печени через изменение активности монооксигеназ. Другим возможным объяснением могут быть полученные в последнее время доказательства усиления перекисного окисления липидов при остром панкреатите [9]. Тогда снижение активности СYP может происходить за счет изменения его фосфолипидного окружения, вызванного свободнорадикальными механизмами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова В. Г., Сергеев В. И. (1986) Острый панкреатит, М.: Медицина.
2. Dailey H. A., Strittmatter P. (1981) J. Biol. Chem., **256**, 3951-3955.
3. Gulyaeva L.F., Grishanova A Ju., Lyakhovich V.V. (1994) J. Biochem., **59**, 383-387.

4. Мичурин В. Ф. (1971) "Актуальные вопросы общей и неотложной хирургии" Вып.2, Киев, с.181-183.
5. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem. **239**, 2379-2385.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
7. Burke M.D., Mayer R.T., Kouri R.E. (1951) Cancer Res., **37**, 460-464.
8. Дюбенко К. А. (1981) Вестник АН УССР, **11**, 30-31.
9. Paine A.J. (1978) Biochem. Pharmacol., **27**, 1805-1813

Поступила 26.04.2002.

THE LONG-TERM INFLUENCE OF AROCHLOR 1254 ON MICROSOMAL MONOOXYGENASE SYSTEM OF RAT LIVER AT ACUTE PANCREATITIS

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

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

Constitutive activities of the liver cytochromes P450 1A1, 1A2, 2C6 and 2B1 were lower in rats with the acute experimental pancreatitis during ten days of this disease.

In rats pretreated with a single dose of Arochlor 1254 on the second day of pancreatitis activities of these enzymes remained elevated to the tenth day.

Thus, acute pancreatitis caused long-term suppression of microsomal monooxygenase system, whereas induction by Arochlor 1254 increased cytochromes P450 activity in both control animals and in rats with pancreatitis.

Key words: acute pancreatitis, cytochrome P450, induction, Arochlor 1254