УДК 612.354.2.085:577.152.1]:613.863+612.67

АКТИВНІСТЬ НАДФН:2,6-ДІХЛОРФЕНОЛІНДОФЕНОЛ РЕДУКТАЗИ ПЕЧІНКИ ДОРОСЛИХ ТА СТАРИХ ЩУРІВ ПРИ ІМОБІЛІЗАЦІЙНОМУ СТРЕСІ

Рудько Н.П., асистент, *Давидов В.В., д.м.н., професор

Запорізький державний медичний університет

** Харківський державний університет*

При старінні відбувається обмеження швидкості процесів біотрансформації ендогенних субстратів та ксенобіотиків в печінці [1]. Причиною цього є вікове зниження активності переносників мікросомальних оксигеназних ланцюгів [2]. Разом з тим до теперішнього часу відсутні відомості про роль стресу у формуванні вікових зсувів з боку процесів мікросомального окислення в печінці при старінні. Вивчення цього питання відчиняє широкі перспективи для розробки нових підходів до лікування та профілактики патології печінки в похилому віці.

Важливу роль у функціонуванні оксигеназних ланцюгів мікросом відіграє НАДФН-редуктаза [3]. Враховуючи це, з метою виявлення вікових особливостей функціонування цього ферменту при стресі, нами було проведено дослідження НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктазної активності мікросом печінки дорослих та старих імобілізованих щурів. Беручи до уваги роль субстрату в регуляції швидкості ферментативної реакції, виміри проводили з різними концентраціями НАДФН в середовищі інкубації.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано 30 щурів лінії Вістар самців, дві вікові групи: дорослі (10-12 міс.) та старі (22-25 міс.). Тварини обох груп, у свою чергу, розподіляли на 2 підгрупи: 1 - інтактні та 2 - щурі, що зазнавали імобілізаційного стресу шляхом фіксації на спині протягом 30 хвилин. Ефективність проведення стресу контролювалася патоморфологічно та за зміною рівня глюкокортикоїдних гормонів у крові [4].

Тварин декапітували. Екстирпірували та відмивали від крові печінку. Наважка печінки використовувалась для приготування 10% гомогенатів на 1,15% KCl. Одержані гомогенати фільтрували через 2 шари марлі та центрифугували протягом 15 хвилин при 9000 g. Супернатанти знову центрифугували при 105000 g на протязі 60 хвилин. Одержані осади суспендували з 1 мл 1,15% KCl та використовували грубу мікросомальну фракцію. Усі процедури проводили при 2-4^{o} С.

В суспензії грубої мікросомальної фракції виявляли активність НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази [5]. У попередніх експериментах було проведено вивчення впливу концентрації субстрату (НАДФН) на активність ферменту. На основі їх результатів у роботі використовувалися концентрації НАДФН відповідно 100 [5] та 40 мкМоль. Вміст білка в пробах виявляли за Лоурі.

Одержані дані статистично обробляли за методом Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Проведені дослідження показали, що активність НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази мікросом печінки дорослих та старих щурів при стресі достовірно не змінювалася, але відмічається тенденція до її зниження. У старих щурів ця тенденція реалізувалася в частковому інгібіруванні ферменту при визначенні його активності в умовах зменшеної концентрації субстрату в реакційній суміші. Як можна бачити з таблиці 1, активність НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази мікросом печінки у старих щурів при імобілізації знижувалася на 21 % порівняно з її рівнем у інтактних тварин. У дорослих щурів подібний зсув не виявляється.

Таблиця 1. Активність НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази мікросом печінки дорослих та старих щурів з різними концентраціями субстрату в реакційній суміші ($M \pm m$; n)

Концентрація НАДФН (мкМоль)	Дорослі		Старі	
	Інтактні	Стрес	Інтактні	Стрес
100	$9,4 \pm 0,9$ (6)	$7,5 \pm 0,5$ (5)	$9,8 \pm 0,8$ (5)	$9,1 \pm 0,3$ (5)
40	$3,4 \pm 0,3$ (6)	$2,8 \pm 0,2$ (6)	$3,9 \pm 0,3$ (5)	$3,1 \pm 0,1$*) (6)

Примітка: активність виражена в нмоль/мг білка·хвилин

*) - $p < 0,05$ з інтактними

Аналіз отриманих даних вказує на те, що при стресі в старих тварин змінюються каталітичні властивості НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази мікросом печінки. Підтвердженням цього служить часткове інгібірування ферменту при визначенні його активності в реакційній суміші зі зменшеним вмістом субстрату, тобто в умовах, що імітують зміну його концентрації в печінці in situ.

В основі виявленого зсуву може лежати обумовлена стресом окислювальна модифікація поліпептидного ланцюга ферменту [6, 7]. Важливим доказом на користь цього припущення служить факт інгібірування НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази при введенні щурам даної вікової групи антиоксидантного препарату Румосол [8]. (Рис. 1).

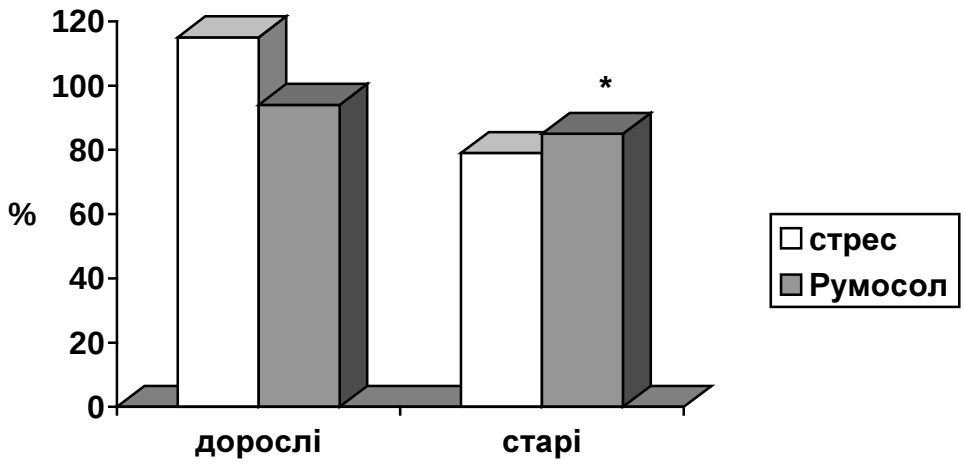


Рис. 1- Вплив румосола на активність НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази мікросом печінки старих щурів при імобілізаційному стресі.

В експериментах використовували по 6 щурів. Тваринам за 60 хвилин до імобілізації робили ін'єкції морфолінієвої солі 3-(4-піріділ)-1,2,4 –тіотріазоліл-5-меркаптооцтової кислоти (Румосол) у дозі 5 мг на 100 г маси.

Кінцева концентрація НАДФН у середовищі інкубації складала 40 та 100 мкМоль.

Реалізація ефекту окислювального стресу в модифікації молекули редуктази, що супроводжується зміною її властивостей, відбувається тільки в печінці старих тварин. Це може бути пов'язано з віковими особливостями стану антиоксидантних систем організму [9, 10].

Реалізація ефекту окислювального стресу в модифікації молекули редуктази, що супроводжується зміною її властивостей, відбувається тільки в печінці старих тварин. Це може бути пов'язано з віковими особливостями стану антиоксидантних систем організму [9, 10].

Обмеження активності НАДФН:2,6-діхлорфеноліндофенол редуктази в умовах, які моделюють зміни концентрації субстрату в тканинах внутрішніх органів при стресі, передумовлює порушення функціонування початкової ділянки гідроксилазного ланцюга мікросом печінки в старих щурів. Формування цього зсуву створює умови для порушення процесів мікросомального окислення в печінці старих щурів при стресі. Останнє сприяє обмеженню антитоксичної функції печінки, що в умовах зміни метаболізму при стресі, вносить певний вклад в зниження резистентності організму до пошкоджуючої дії стресу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Schmucker D.L. Age-related changes in drug disposition: an update//Pharmacol.Rev.- 1985.- vol. 37.- P. 133 – 148.
2. Schmucker D.L., Vessey D.A., Wang R.K., James J.L., Maloney A. Age-dependent alterations in the physicochemical properties of rat liver microsomes//Mech.Ageing Dev.- 1984.- 27,N2. – P. 207 – 217.
3. Карякин А.В., Арчаков А.И. Межмембранный перенос электронов //Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии.-1985. – Т.5.- С.38 – 81.
4. Швец В.Н., Давыдов В.В. Особенности защитного действия антиоксидантов на сердце крыс разного возраста при стрессе//Биохимия стресса и пути повышения эффективности лечения заболеваний

стрессорной природы.- Материалы Всеукраинского симпозиума с международным участием.- Запорожье,1992. – С.64-67.

5. Карузина И.И., Арчаков А.И.. Выделение микросомной фракции печени и характеристика ее окислительных систем//Современные методы в биохимии.- М.:Медицина, 1977. – С. 49 – 62.
6. Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T. Stable markers of oxidant damage to protein and their application in the study of human disease//Free Radical.Biol.Med.- 1999.- 27,N11-12.- P. 1151- 1163.
7. Pantke U., Volk T., Schmutzler M., Kox W.J., Sitte N., Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery//Free Radical.Biol.Med.- 1999.- 27,N 9-10.- P. 1080- 1086.
8. Панасенко А.И., Кечин И.Л., Давыдов В.В., Швец В.Н. Изучение антиоксидантных свойств морфолиния 3 - (4 -пиридил) - 1,2,4 – триазолил – 5 – тиоацетата (румосола) в эксперименте на крысах, подвергнутых иммобилизационному стрессу//Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. 1998.- Т.1.-N 2.- С. 91 – 93.
9. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе//Успехи современной биологии.- 1993.- 113,N4.- С. 456 – 470.
10. Michiels C., Raes M., Tonsaint O., Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu,Zn- superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress// Free Radic. Biol.Med.- 1994.- 17,N3.- P. 235 – 248.
11. Чеботарев Д.В., Коркушко О.В. Стресс и возраст. Клинико-физиологическое исследование//Тер.Архив.- 1977.- N 2.-С.121 – 126.
12. Lakatta E.G. Age-related alteration in the cardiovascular response to adrenergic mediated stress//Fed.Proc.- 1980.- 39.- P. 3173 – 3177.