

ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

На правах рукопису

ПАРАМОНОВА
Галина Іванівна

**РЕГУЛЯЦІЯ МІКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ
В ПЕЧІНЦІ ПРИ СТАРІННІ**

03.00.04 - біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1994



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті геронтології АМН України.

Науковий консультант: академік НАН та АМН України,
доктор медичних наук, професор
В.В.Фролькіс

Офіційні опоненти: доктор медичних наук О.К.Кульчицький;
член-кореспондент НАН та АМН України,
доктор біологічних наук, професор Н.М.Гула;
доктор біологічних наук, професор В.В.Лемешю

Провідна організація - Фізико-хімічний інститут НАН України

Захист відбудеться "30.03".....1995 р. о 13.40г на засі-
данні спеціалізованої вченої ради Д 001.28.01 для захисту дисер-
тацій в Інституті геронтології АМН України за адресою: 254114,
м.Київ, вул.Вишгородська, 67.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
геронтології АМН України.

Автореферат розісланий "23".....02..... 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
медиц. т медичних наук

Р. І. ПОТАПЕНКО

AB - 32.034

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми

Старіння організму приводить до обмеження його адаптаційних можливостей та в результаті цього - до розвитку вікової патології [В.В.Фролькис, 1981, 1984, 1988, 1990]. Дана проблема набуває особливого значення в наш час в зв'язку з несприятливими екологічними умовами та прогресуючою хімізацією навколишнього середовища [G.M.Martin, 1985; Ю.И.Губский и др., 1993]. Не викликає сумніву, що ксенобіотики справляють значний вплив на розвиток багатьох видів вікової патології [В.В.Худолей, И.Г.Майорова, 1988; В.Н.Анисимов, 1988; F.G.Gonzalez, H.V.Gelboin, 1993]. Зниження адаптаційних можливостей системи мітросомального окислення печінки при старінні [R.C.Adelman, 1971, 1972; В.В.Лемешко, 1980, 1983] приводить до підвищення чутливості організму до дії хімічних речовин екогенного походження. Ця проблема має велике теоретичне значення, оскільки не тільки токсиканти навколишнього середовища, але й лікарські засоби, що їх широко застосовують в геріатричній практиці, у більшості своєї є ксенобіотиками, які метаболізуються системою мітросомального окислення, тому їх фармакокінетика та фармакодинаміка залежать від активності цієї системи [Н.Я.Головенко, 1981; Н.Я.Головенко, Т.Л.Карасева, 1983; M.Rawkins et al., 1987; K.Kitani, 1988; C.Loi, R.Vestal, 1990]. Комплексне застосування фармакологічних препаратів може приводити як до змін в функціонуванні ферментів мітросомального окислення печінки, так і до виникнення побічних ефектів, ускладнень лікарської терапії [И.С.Чекман, 1980; В.В.Белюсов и др. 1993; P.Lamy, 1980].

В рішенні вищезазначених питань особливої уваги набуває проблема регуляції мітросомального окислення при старінні, що включає внутрішньоклітинні та нейрогуморальні механізми. В літературі накопичені численні відомості про те, що активність мікро-

сомальних ферментів залежить від типу та кількості субстратів окислення, гормонального статусу організму [А.И.Арчаков, 1975, 1983; В.В.Ляхович, И.Б.Цырлов, 1978, 1981; Л.А.Тиунов, 1981, 1992]. Значно менша увага приділяється ролі нейрогуморальних механізмів в регуляції активності детоксикаційних процесів, повністю відсутні літературні дані з цього питання в віковому аспекті. Не вивчена внутрішньоклітинна регуляція активності мітосомальних монооксигеназ, що опосередкована станом плазматичної мембрани (ПМ) гепатоцитів.

При вивченні вікових змін процесів детоксикації важливо враховувати, що основна монооксигеназа мітосомальної системи - цитохром Р-450 є мембранов'язаним ферментом, тому зміни фізико-хімічних властивостей мембран гепатоцитів, що відбуваються під час старіння, можуть суттєво впливати на активність процесів мітосомального окислення. Проте дослідження, що проводились в цьому напрямку, мають фрагментарний характер та потребують подальшого поглиблення. Старіння є багатопричинним процесом, але серед великої кількості факторів, що впливають на його розвиток та тривалість життя (ТЖ), найбільша увага, починаючи з класичних робіток І.І.Мечнікова, [1907], приділяється процесам інтоксикації організму. Разом з тим, до цього часу лишається невивченим питання про наявність взаємоз'язку між ТЖ та рівнем детоксикаційних процесів в організмі. Все це обґрунтовує актуальність вивчення вікових змін системи мітосомального окислення печінки та експериментальних пошуків збільшення ТЖ шляхом підвищення надійності детоксикаційних процесів.

Мета та задачі дослідження.

Мета роботи - охарактеризувати функціональний стан системи ферментів мітосомального окислення в печінці при старінні та вивчити шляхи регуляції її ферментативної активності, включаючи

як внутрішньоклітинні, так і надклітинні рівні, а також розглянути взаємозв'язок між активністю детоксикаційних процесів та індивідуальною і видовою тривалістю життя.

До задач роботи входило:

1. Вивчити ізоформний склад цитохрому P-450, активність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та фізико-хімічні властивості мембран ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів дорослих та старих щурів.
2. Вивчити функціональну надійність системи мітосомального окислення в печінці при старінні в умовах тривалого введення індуктору мітосомальних монооксигена фенobarбіталу (ФЕ).
3. Вивчити роль плазматичної мембрани в функціонуванні системи ферментів мітосомального окислення в печінці при старінні.
4. Вивчити роль нервових та гуморальних впливів в регуляції активності ферментів мітосомального окислення в печінці при старінні.
5. Вивчити вплив стресу на активність ферментів мітосомального окислення, ПОЛ та фізико-хімічні властивості мітосом печінки дорослих та старих щурів.
6. Вивчити взаємозв'язок між видовою та індивідуальною ТЖ тварин та рівнем мітосомального окислення в печінці.
7. Вивчити вплив додаткової детоксикації організму (ентеросорбції) на активність ферментів мітосомального окислення в печінці та ТЖ.

Наукова новизна та теоретична цінність досліджень:

Дана робота являє собою перше комплексне експериментальне дослідження, що присвячене вивченню нейрогуморальної та внутрішньоклітинної регуляції активності ферментів мітосомального окислення в печінці при старінні та взаємозв'язку між рівнями детоксикаційних процесів та ТЖ тварин.

Вперше показано, що при старінні змінюється ізоформний склад цитохрому Р-450 та фізико-хімічні властивості мембран ендоплазматичного ретикулулу гепатоцитів. В умовах тривалого введення індуктору у старих тварин порушується синтез окремих ізоформ цитохрому Р-450, змінюються його монооксигеназна активність та субстратна специфічність, що призводить до зниження адаптаційних можливостей мікросомальної детоксикаційної системи печінки у старості.

Вперше показано, що при старінні змінюється внутрішньоклітинна регуляція індуктивного синтезу мікросомальних монооксигеназ, що опосередковано станом ПМ гепатоцитів.

Вперше встановлено, що при старінні нервовий контроль над системою мікросомального окислення печінки послаблюється, і ця обставина може являти собою одну з причин зниження детоксикаційної функції печінки у старості. На моделі гетерохронного парабіозу показано, що гуморальні фактори організму, який старіє, справляють пригнічуючий вплив на детоксикаційну функцію печінки.

Вперше показано, що тривалий емоційно-больовий стрес (ЕВС) викликає різке зниження вмісту цитохрому Р-450 та монооксигеназної активності мікросом печінки, особливо виражене у старих тварин, що призводить до їх загибелі в умовах надходження в організм субтоксичних доз ксенобіотиків. При більш помірних стресових впливах спостерігається двофазний характер змін - слідом за зниженням монооксигеназної активності мікросом печінки настає її підвищення. Зниження активності мікросомальних монооксигеназ в ранні строки після стресу супроводжується активацією ПОД та суттєвою модифікацією мембран ендоплазматичного ретикулулу гепатоцитів. Зміни монооксигеназної активності, які спостерігаються, більш виражені у старих тварин, ніж у дорослих, що свідчить про зниження адаптаційних можливостей детоксикаційної функції печінки

у старості за умов стресових впливів.

Вперше проведено порівняльне вивчення вікових змін активності ферментів мікосомального окислення печінки у тварин з різною видовою ТЖ. Встановлено, що зміни монооксигеназної активності гепатоцитів, які настають при старінні, відносяться до хронобіологічних, тобто залежать від віку тварин.

Вперше виявлено позитивну кореляцію між індивідуальною ТЖ та активністю ферментів мікосомального окислення печінки. Високий рівень детоксикаційних процесів є одним з механізмів, що направлені на підтримання життєдіяльності та забезпечення високої індивідуальної ТЖ.

Вперше показано, що додаткова детоксикація організму старих тварин, що викликана ентеросорбцією, призводить до підвищення ТЖ. Геропротекторна дія ентеросорбції пов'язана із підвищенням діапазону адаптаційних можливостей системи ферментів мікосомального окислення печінки.

Практичне значення отриманих результатів:

Практичне значення мають дані про застосування ентеросорбентів на пізніх етапах онтогенезу як геропротекторів, а також застосування методу прижиттєвого тестування тварин по тривалості наркотичного сну з метою виявлення особин-довгожителів в популяції. Експериментальні дані, що одержані, мають практичне значення також для розробки принципів раціональної фармакотерапії у осіб похилого та старечого віку за умов тривалого застосування лікарських засобів.

Особистий внесок дисертанта у розробку наукових результатів, що виносяться на захист. Автором дисертаційної роботи особисто розроблено програму та методологію досліджень, виконано всі біохімічні методики, самостійно проведено облік та аналіз всього одержаного первинного матеріалу, сформульовані основні положення

та висновки роботи.

Основні положення, що вносяться на захист

1. При старінні змінюється ізоформний склад цитохрому Р-450 та фізико-хімічні властивості мембран ендоплазматичного ретикулу гепатоцитів.
2. Система ферментів мітросомального окислення печінки знаходиться під контролем нейрогуморальної регуляції; послаблення нервового контролю та дія гуморальних факторів приводять до зниження детоксикаційної функції печінки в старості.
3. В старості за умов функціональних навантажень та стресових впливів адаптаційні можливості системи ферментів мітросомального окислення знижуються.
4. Існує взаємозв'язок між активністю ферментів мітросомального окислення печінки та ТЖ; високий рівень детоксикаційних процесів є одним з механізмів, що забезпечують значну ТЖ.
5. Додаткова детоксикація організму, що спричиняється ентросорбцією, супроводжується підвищенням ТЖ; геропротекторний вплив ентросорбції пов'язаний із збільшенням адаптаційних можливостей системи ферментів мітросомального окислення печінки.

Впровадження результатів дослідження у практику.

Розроблено метод прижиттєвого тестування щурів шляхом вищачення очікуваної ТЖ, що може бути використано в експериментальних дослідженнях, пов'язаних з довгостроковими спостереженнями над виживаемістю тварин в геронтологічних, токсикологічних, радіобіологічних та фармакологічних дослідженнях. Апробація дисертації проведена 16 вересня 1994 р. на розширеному засіданні вченої ради Інституту геронтології АМН України.

Матеріали дисертації доповідались та обговорювались на наукових конференціях, з'їздах та симпозіумах: II Симп. "Цитогенетика старіння" (Тбілісі, 1984), Конф., присв. пам'яті Р.В.Фоль-

борта (Черкаси, 1985), II Всес. симп. "Цитохром P-450 и охрана внутренней среды человека" (Москва, 1985), VII Міжнар. симп. а гемоперфузії (Київ, 1986), V Всес. біохім. з'їзді (Київ, 1986), XII Укр. з'їзді фізіологів (Львів, 1986), Всес. симп. "Нейрогуморальные механизмы старения" (Київ, 1986), III Всес. конф. "Цитохром P-450 и охрана окружающей среды" (Новосибірськ, 1987), Всес. конф. "Реактивность и резистентность" (Київ, 1987), I З'їзді геронтологів і геріатрів УРСР (Дніпропетровск, 1988), V Всес. з'їзді геронтологів та геріатрів (Тбілісі, 1988), V Всес. симп. "Цитохром P-450 и модификация макромолекул" (Ялта, 1989), Всес. симп. "Гериатрические средства: экспериментальный поиск и клиническое использование" (Киев, 1990), XIII З'їзді Укр. фізіол. товариства (Харків, 1990), Респ. науково-практ. конф. "Синтез и применение энтеросорбентов" (Конаково, 1990), IV Регион. конгр. а геронтології (Йокогама, 1991), Симп. "Биологические механизмы старения" (Харків, 1994), XIV З'їзді Укр. фізіол. товариства (Київ, 1994).

З матеріалів дисертації опубліковано 54 наукові праці, з яких: 1 - колективна монографія, 22 - статті, 1 авторське свідоцтво, 10 зарубіжних публікацій.

Структура та обсяг роботи:

Дисертація викладена на 299 сторінках машинописного тексту, складається з вступу, аналітичного огляду літератури, 6 глав власних досліджень з обговоренням, заключення, висновків та списку літератури, що вміщує 365 джерел, з яких 157 вітчизняних та 208 іноземних авторів. Текст ілюстровано 41 таблицею та 23 малюнками.

З М І С Т Р О Б О Т И.

Матеріали та методи досліджень.

Основні серії експериментів були проведені на паспортизованих вухах-самцях лінії Вістар двох вікових груп: дорослі (6-8 міс) та старі (26-28 міс). В окремій серії експериментів було використано ще 4 види тварин двох вікових груп: миші лінії СВА - дорослі (10-12 міс) та старі (24-26 міс); морські свинки - дорослі (10-12 міс) та старі (4-4,5 роки); кролі - дорослі (1-1,5 роки) та старі (5-6 років); беспорідні собаки - дорослі (2-5 років) та старі (14-18 років). Всього в дослідках було використано 678 щурів, 39 мишей, 19 морських свинок, 14 кролів та 13 собак.

Індукцію мікросомальних монооксигеназ печінки здійснювали введенням фенобарбіталу. В залежності від мети дослідження ФБ вводили в дозі 80 мг/кг маси, внутрішньоочеревинно, протягом 3 діб, або довгостроково, протягом 26 тижнів з питною водою у вигляді 0,1 % розчину (доза на добу - 45-46 мг/кг).

Операції по утворенню гетерохронних парабіотичних пар проводили на мишах лінії СВА за 2-4 міс перед дослідженням за методом E. Kunster, R.R. Meyer (1933). В парабіотичні пари об'єднували тварин 4-8 міс та 27-30 міс'віку.

ЕБС моделювали за методом Ф.П.Ведяєва та Т.М.Воробйової (1983).

Фармакологічну денервацію печінки здійснювали з використанням α - та β -адреноблокаторів дибенаміна, анаприліна, симпатолітика ресерпіна та М-холінолітика атропіна. Хірургічну денервацію - шляхом двостороннього перерізування черевних нервів (часткова денервація) та піддіафрагмальної стовлової ваготомії. Операції здійснювали за умов пентобарбіталового наркозу (25 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Через 7 діб після операції тварин деканітували під ефірним наркозом.

Ентеросорбцію проводили з використанням вуглецевого сорбенту марки СКН. Шури отримували сорбент з їжею із розрахунку 1 мл на 100 г маси тіла, починаючи з 28-міс віку.

В мікросомній фракції (105 000 g, 60 хв), та, в окремих серіях дослідів, в постмітохондріальному супернатанті (9 000 g, 20 хв) печінки [И.И.Карузина, А.И. Арчаков, 1977], визначали вміст цитохромів P-450 та b₅ методом двопрменевої диференціальної спектрофотометрії [T.Omura, R.Sato, 1964], амінопіриндеметилаану (АПДаану) активність [R.R.Stitzel et al., 1966] в модифікації А.І.Арчакова та ін. [1968] та анілінгідроксилаану активність (АГХаану) [И.И.Карузина, А.И.Арчаков, 1977].

Електрофоретичне розділення білків мікросом здійснювали методом SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі за U.K.Laemmly [1970]. Розрахунок молекулярних мас (м.м.) поліпептидів проводили за методом K.Weber и M.Osborn [1969] з використанням стандартів м.м (РТМ4, фірма "Serwa").

ПМ печінки виділяли модифікованим методом P.Dorling, R.Le Page [1973]. У фракції ПМ визначали активність Na⁺, K⁺-АТФазу [J.D.Robinson, I.Flashner, 1979], 5'-нуклеотидази [R.H.Michell, J.N.Hawthorn, 1965], концентрацію P_i [W.Rathburn, V.Betlach, 1969]. Інкубацію фракції ізольованих плазматичних мембран із цитозолем гепатоцитів та сироваткою крові здійснювали in vitro при температурі 0-4 °C протягом 40 хв, після чого додавали АТФ та визначали АТФазні активності.

Активність процесів ПОЛ в мікросомах оцінювали за накопиченням малонового діальдегіду (МДА) [Ю.А.Владимиров, А.И.Арчаков, 1972, в модифікації Ю.І.Губського, 1978], та за вмістом дієнових кон'югатів (ДК). [В.А.Костюк и др., 1984]. Спектри поглинання мікросомальних мембран вимірювали в УФ-області (210-370 нм) за О.П.Демченком [1981].

Структурно-динамічні параметри мембран мікросом печінки вивчали із застосуванням флуоресцентних зондів пірену та 1,8-АНС, спектри власної флуоресценції вимірювали при довжині хвилі збудження 280 нм [Ю.А.Владимиров, Г.Е.Добрецов, 1980; Ю.И.Губский и др., 1989]; дослідження проводили на реєструючому спектрофлуориметрі "Hitachi MPF-4".

Вміст білку визначали за методом O.H.Lowry et al. [1951].

Тривалість наркотичного барбітуратового сну оцінювали за ефектом бокового положення щурів до появи локомоторних реакцій після введення пентобарбіталу натрію в дозі 25 мг/кг.

Величину мембранного потенціалу (МП) клітин печінки визначали за допомогою мікроелектродної техніки [П.Г.Костюк, 1960].

Вікову динаміку смертності тварин оцінювали за кривими виживання, а також в координатах рівняння Гомпертца: $R_t = R_0 \cdot e^{-\alpha t}$ [В.В.Фролькіс, Х.К.Мурадян, 1988].

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики, кореляційний аналіз взаємозв'язку між активністю ферментів мікросомального окислення печінки та ТЛ тварин здійснювали з розрахунком рівнянь лінійної регресії [В.Б.Урбах, 1964; И.П.Ашмарин и др., 1971].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вікові зміни системи ферментів мікросомального окислення печінки та мембранні механізми її регуляції

Проведені дослідження показали, що при старінні загальний вміст цитохрому P-450 та монооксигеназна активність мікросом печінки, що визначається *in vitro* із застосуванням субстратів амінопірину т: аніліну, суттєво не змінюються, проте, в цих умовах настає зміна у співвідношенні окремих ізоформ цитохрому P-450 - відносний вміст ізоформ з м.м. 48, 52 та 55 кД зменшується та зростає вміст ізоформ з м.м. 50, 54 та 56 кД (табл.1).

Зміни ізоформного складу цитохрому P-450 можуть приводити до змін в субстратній специфічності гемопротейду та підвищенню чутливості організму до дії коензотиків. Особливе значення може мати підвищення у старих щурів відносного вмісту так званих "метилхолантрен-індукованих" ізоформ цитохрому P-450 з м.м. 54 та 56

Таблиця 1.

Вплив 3-денного введення ФБ на розподіл ізоформ цитохрому P-450 у дорослих та старих щурів *) (n=6)

М.м.,	Дорослі			Старі			Дорослі/ старі
	К	ФБ	ФБ/К	К	ФБ	ФБ/К	
кД							
58	11.35	6.91	0,61	10.65	8.85	0,83	0,94
56	15.80	11.21	0,71	21.68	12.20	0,56	1,37
55	9.08	3.65	0,40	6.79	4.72	0,70	0,75
54	3.97	2.61	0,66	5.84	4.42	0,76	1,47
52	11.73	9.12	0,78	10.18	9.44	0,93	0,87
51	13.24	21.38	1,62	13.00	12.98	1,00	0,98
50	4.92	11.21	2,28	6.03	9.83	1,63	1,22
48	29.89	33.90	1,13	25.82	37.56	1,46	0,86

*) Відношення площин окремих поліпептидів до загальної площини (%).

кД, синтез яких активується в умовах надходження канцерогенних хімічних сполук [А.И.Арчаков, 1975; В.Н.Анисимов, 1998; В.В.Худольей, И.Г.Майорова, 1988], що може спричинити хімічний канцерогенез.

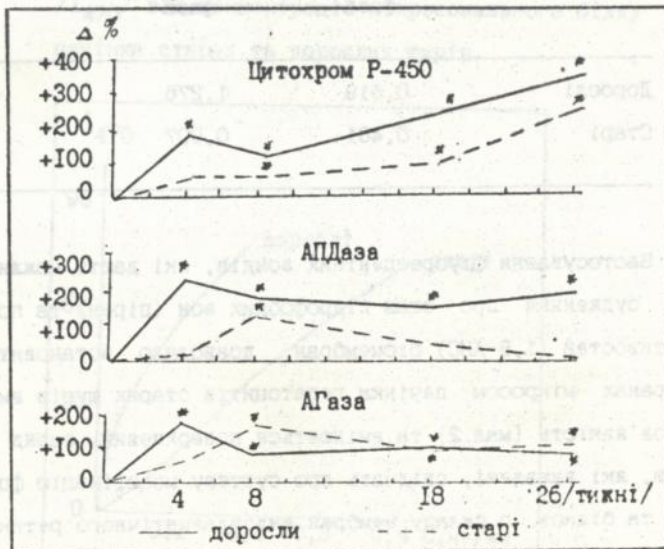
Зміна у співвідношенні окремих ізоформ цитохрому Р-450 при старінні особливо чітко виявляється за умов введення тваринам індукторів. У старих щурів трьохденне введення ФБ (табл.1) спричиняє менш виражений приріст ФБ-індукованих ізоформ цитохрому Р-450 (48, 50 та 51 кД) у порівнянні із дорослими тваринами, що свідчить про послаблення їх синтезу.

Враховуючи ці дані, особливий інтерес становило вивчення впливу тривалого введення ФБ на функціональний стан системи ферментів мікросомального окислення печінки дорослих та старих щурів з метою виявлення надійності процесів детоксикації в старості. Проведені дослідження встановили (мал.1), що при тривалому, протягом 28 тижнів, введенні ФБ дорослим та старим щурам зберігається адатність гепатоцитів до індукції цитохрому Р-450, проте в цих умовах спостерігаються суттєві вікові відмінності в динаміці змін активності мікросомальних монооксигеназ. У дорослих щурів вміст цитохрому Р-450 підвищувався після 4-тижневого введення ФБ, а у старих тварин - тільки після 8-тижневого строку, що свідчить про збільшення латентного періоду дії індуктору. Суттєві вікові відмінності у величині індуктивної відповіді спостерігались і в більш пізні строки дослідження. Крім того, спостерігалась різниця в гідроксилуванні субстратів різних типів: активність АПДаз у дорослих тварин, досягнувши максимальних значень до 4-го тижня, підтримувалась на високому рівні протягом всього подальшого періоду введення препарату, тоді як у старих щурів після підвищення АПДазної активності через 8 тижнів відбувалось її зниження, і через 18 тижнів цей показник не відрізнявся від контролю. АГаана активність, як у дорослих, так і у старих щурів підтримувалась на високому рівні протягом всього періоду введення ФБ. Ці дані свідчать про те, що при старінні в умовах довгострокового введення індуктору порушується синтез окремих ізоформ цитохрому Р-450, що

приводить до своєрідного "ариву" генетичної індукції та змін субстратної специфічності цитохрому Р-450. "Вичерпання" синтезу окремих ізоформ цитохрому Р-450 при тривалому введенні ФБ свідчить про зниження адаптаційних можливостей мікросомальної детоксикаційної системи в старості. Можна вважати, що феномен "вичерпання" генетичної індукції є загальною закономірністю процесу старіння, що характерно також і для інших білків, зокрема для індукції тирозинамінотрансферази печінки гідрокортизоном (В.В.Фролькис, Л.С.Мандельблат, 1970).

Як відомо, цитохром Р-450 є мембранозв'язаним ферментом, та його каталітична активність і взаємодія з субстратом залежать від фосфоліпідного складу мембран ендоплазматичного ретикулулу гепатоцитів. Одним з кардинальних факторів, що визначають каталітичні

Вплив тривалого введення ФБ на вміст цитохрому Р-450, АПДазу та АГаза активності мікросом печінки дорослих та старих щурів.



Мал. I

властивості мембраноз'язаних ферментів, являється ПОЛ. В наших дослідженнях було встановлено, що в мітросомах печінки старих щурів у порівнянні з дорослими знижується активність спонтанного (неіндукованого) та не змінюється - індукованого NADPH та аскорбатом ПОЛ. При цьому в мітросомальних мембранах зменшується вміст ДК - первинних продуктів спонтанного ПОЛ (табл.2). Вікові відмінності, що спостерігаються у вмісті ДК, можуть бути пов'язані із змінами жирнокислотного складу мембран ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів старих щурів.

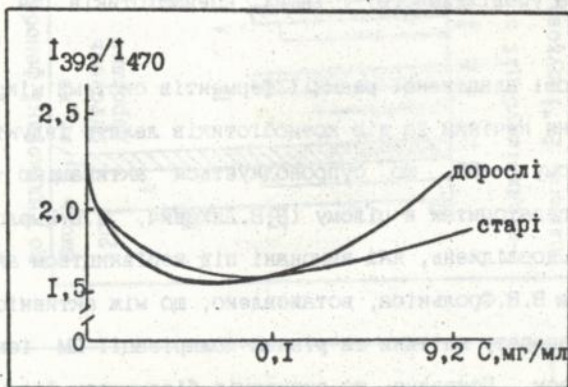
Таблиця 2.

Вміст ДК (нмоль/мг білку) в мітросомах печінки дорослих та старих щурів (об'єднані мітросоми від 6 тварин)

Вік тварин	Локалізація в ліпідному екстракті	
	Гептанова фаза	Ізопропанолова фаза
Дорослі	0,619	1,276
Старі	0,481	0,907

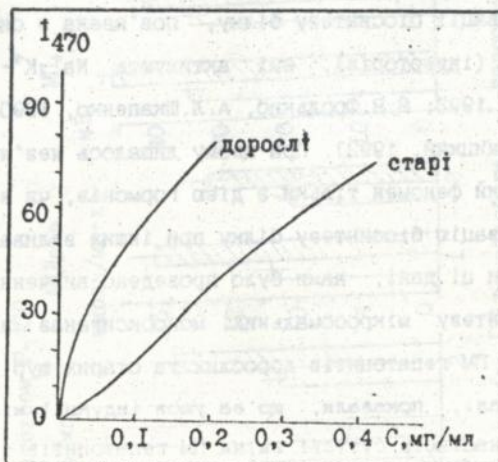
Застосування флуоресцентних зондів, які дають можливість робити судження про стан гідрофобних зон (пірен) та поверхневих властивостей (1,8-АНС) біомембран, дозволило встановити, що в мембранах мітросом печінки гепатоцитів старих щурів зменшується мі пов'язаність (мал.2) та змінюється поверхневий заряд (мал.3). Зміни, які виявлені, свідчать про суттєву модифікацію фосфоліпидного та білкового складу мембран ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів, які відбуваються при старінні, що може супроводжува-

Зміни параметру I_{392}/I_{470} у флуоресцентному спектрі пірену мікосом печінки дорослих та старих щурів в залежності від концентрації білку.



Мал.2

Залежність інтенсивності флуоресценції I,8-АНС / I_{470} / від концентрації мікосомального білку печінки старих та дорослих щурів.



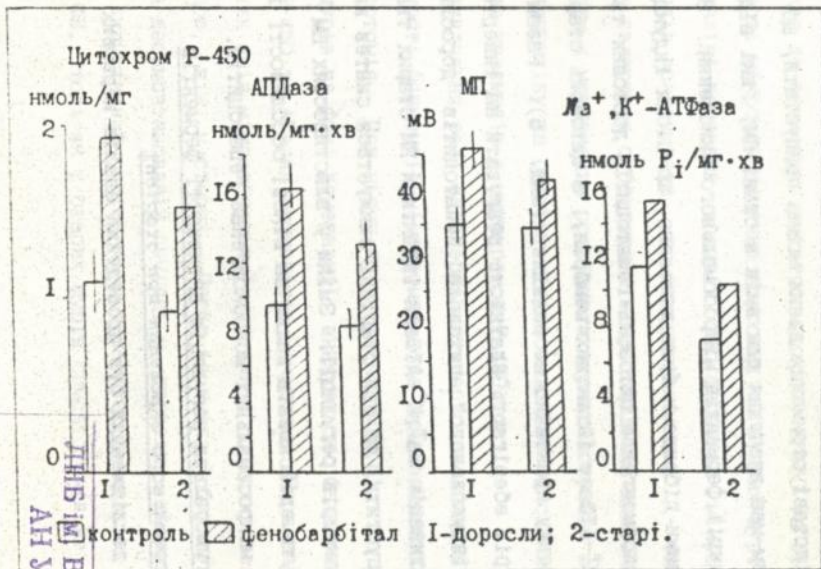
Мал.3

тись відмінностями в функціонуванні мітосомальних монооксигеназ. За рахунок змін в фізико-хімічних властивостях мембран мітосом може змінюватись "доступність" цитохрому P-450 до різних субстратів, що, в свою чергу, може приводити до прискореного метаболізму одних та уповільненого - інших ксенобіотиків та ендогенних субстратів.

В основі адаптивної реакції ферментів системи мітосомально-го окислення печінки на дію ксенобіотиків лежить індуктивний синтез цитохрому P-450, що супроводжується активацією біосинтезу білку в гепатоцитах в цілому [В.В.Ляхович, И.Б.Цырлов, 1981]. Комплексом досліджень, які виконані під керівництвом акад. НАН та АМН України В.В.Фролькіса, встановлено, що між активністю біосинтетичного апарату клітини та рівнем поляризації ПМ існує певний взаємозв'язок. Показано, що активація біосинтезу білку, яка викликана різними факторами (введення гормонів, кровотрата, регенерація), призводить до розвитку гіперполяризації ПМ різних клітин, в тому числі гепатоцитів, а попереднє введення блокторів біосинтезу білку запобігає розвитку гіперполяризації. На основі цих даних було висунуто припущення, що гіперполяризація, яка розвивається при активації біосинтезу білку, пов'язана з синтезом особливих факторів (інверторів), які активують Na^+, K^+ - АТФазу ПМ [В.В.Фролькіс, 1992; В.В.Фролькіс, А.Л.Шкапенко, 1990; В.В.Фролькіс, В.Л.Матреницький, 1993]. При цьому лишалось нез'ясованим, чи пов'язаний даний феномен тільки з дією гормонів, чи він супроводжує також активацію біосинтезу білку при інших впливах.

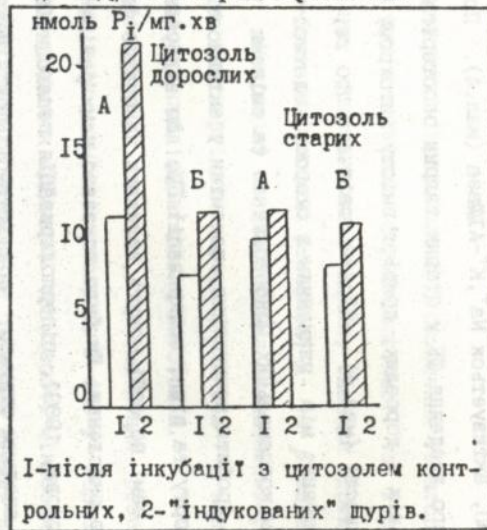
Враховуючи ці дані, нами було проведено вивчення впливу індуктивного синтезу мітосомальних монооксигеназ на активність Na^+, K^+ -АТФази ПМ гепатоцитів дорослих та старих щурів. Результати, які отримані, показали, що за умов індукції мітосомальних монооксигеназ настать суттєві зміни ПМ гепатоцитів - зростає ве-

Вміст цитохрому Р-450, АПДіаза активність мітросом печінки, мембранний потенціал /МП/, активність Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран печінки дорослих та старих щурів при введенні фенобарбіталу.



Мал. 4

Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази у фракції ізольованих плазматичних мембран гепатоцитів дорослих /А/ та старих /Б/ щурів після інкубації з цитозолем гепатоцитів щурів, що індуковані фенобарбіталом.



Мал. 5

личина МП, активується Na^+, K^+ -АТФаза (мал.4). При цьому, після триденного введення ФБ у старих тварин спостерігається менш виражений, ніж у дорослих, приріст вмісту цитохрому P-450 та АЦДааної активності (мал.4). Ці дані свідчать про те, що існує певне співвідношення між зниженням в старості адатності до генетичної індукції мітросомальних монооксигеназ та змінами у властивостях ПМ. Можна зробити припущення, що зміни у активності систем іонного транспорту та рівні поляризації ПМ, що відбуваються за умов індукції, самі по собі можуть впливати на синтез ферментів мітросомального окислення. Як було показано нами раніше [В.В.Фролькіо, Г.И.Парамонова, 1980], гіперполяризація гепатоцитів, що викликана постійним анодним струмом, приводить до пригнічення індуктивного синтезу мітросомальних монооксигеназ, більш вираженого у старих щурів. На підставі отриманих даних можна припустити, що інверторний механізм має значення для змін в стані ПМ, які відбуваються за умов індукції ферментів мітросомального окислення. В дослідках з субклітинними гібридами було показано, що після індукції мітросомальних монооксигеназ цитозоль гепатоцитів дорослих тварин активує Na^+, K^+ -АТФазу інтактних мембран, а цитозоль старих тварин подібного ефекту практично не виявляє (мал. 5). Разом з тим, ПМ старих щурів зберігають адатність реагувати на інвертори. Так, додавання "індукованого" цитозолю гепатоцитів дорослих щурів спричиняє активацію Na^+, K^+ -АТФази інтактних ПМ старих тварин. Це дозволяє припустити, що при старінні знижується синтез внутрішньоклітинних факторів регуляції. Зміни у властивостях ПМ за умов індукції можуть здійснювати вплив на вікові особливості індуктивного синтезу мітросомальних монооксигеназ гепатоцитів.

Нейрогуморальна регуляція активності ферментів мітросомального окислення при старінні

В наших дослідженнях був проведений аналіз нервових впливів

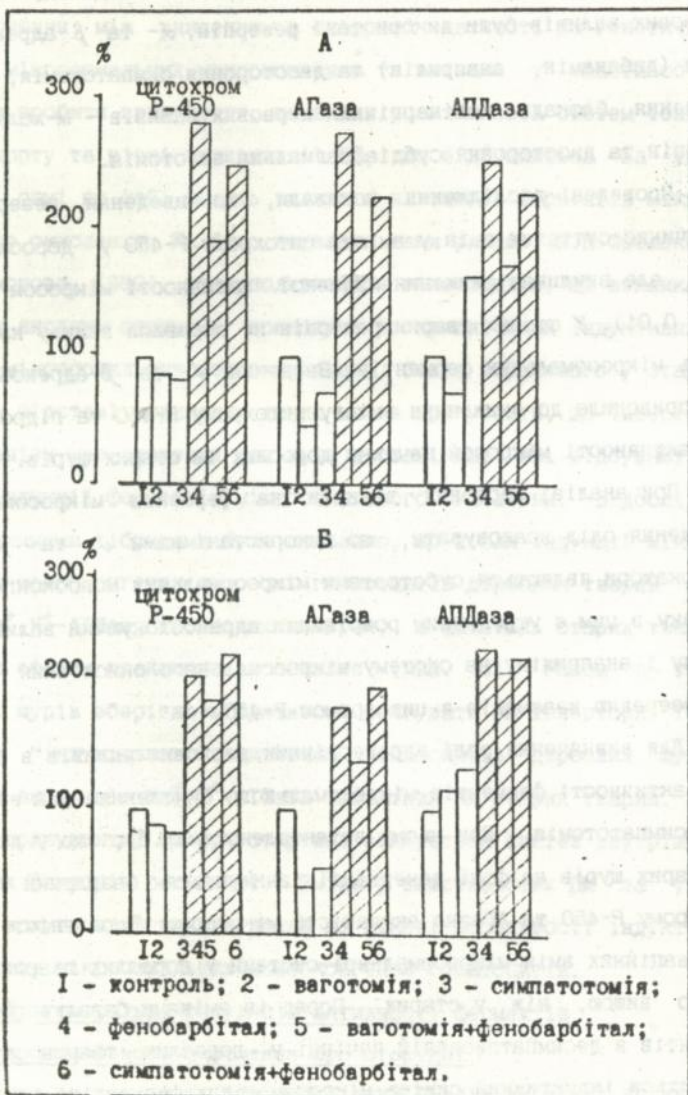
на активність ферментів мітросомального окислення гепатоцитів дорослих та старих щурів в умовах фармакологічної та хірургічної денервації печінки. Для вивчення ефекту блокади адренергічних нервових впливів були використані резерпін, α - та β -адреноблокатори (дибенамін, анаприлін) та двостороння симпатотомія, а для вивчення блокади холінергічних нервових впливів - М-холінолітик атропін та двостороння субдіафрагмальна ваготомія.

Проведені дослідження показали, що введення резерпіну не спричиняє суттєвих змін у вмісті цитохрому Р-450 у дорослих щурів, але викликає зниження АПДаної активності мітросом на 26 % ($p < 0,01$). У старих тварин резерпін не справляв впливу на активність мітросомальних ферментів. Введення α - та β -адреноблокаторів приводило до зниження вмісту цитохрому Р-450 та гідроксилазної активності мітросом печінки дорослих та старих щурів.

При аналізі нервових впливів на ферменти мітросомального окислення слід враховувати, що використані нами α - та β -адреноблокатори являються субстратами мітросомальних монооксигеназ. У зв'язку з цим є утрудненим розрізнити адреноблокуючий вплив дибенаміну і анаприліну на систему мітросомального окислення та їх безпосередню взаємодію з цитохромом Р-450.

Для визначення ролі адренергічних нервових впливів в регуляції активності ферментів мітросомального окислення була застосована симпатотомія. При цьому встановлено (мал.б), що у дорослих та старих щурів на фоні денервації знижуються базальний рівень цитохрому Р-450 та АПана активність мітросом. Вираженість постденерваційних змін мітросомальної системи у дорослих тварин була значно вищою, ніж у старих. Поряд із змінними базального рівня ферментів в десимпатизованій печінці у дорослих тварин суттєво знижується індуктивний синтез мітросомальних ферментів, що викликаний дією ФБ, тоді як у старих щурів симпатотомія не змінювала

Вплив хірургічної денервації печінки на ферменти мітросомального окислення у дорослих /А/ та старих /Б/ щурів.



Мал.6

ступеня індуктивного ефекту ФЕ.

При вивченні впливу парасимпатичної нервової системи на процеси мікосомального окислення в печінці встановлено, що блокада холінергічних ефектів атропіном приводить до збільшення вмісту цитохрому P-450 та АПДазної активності у дорослих та старих щурів. Аналізуючи ці результати, слід враховувати, що введення атропіну спричиняє значне підвищення концентрації кортикостероїдів та АКТГ в крові дорослих тварин та менш виражене - у старих [В.В.Фролькіс и др., 1991].

Активация M-холінергічних рецепторів різноманітними хімічними агентами супроводжується збільшенням входу в гепатоцити іонів Ca^{2+} та перерозподілом пулів цГМФ и цАМФ в печінці в бік відносного зниження цАМФ [С.Н.Голиков и др., 1985]. Можливо, що підвищення активності мікосомальних монооксигеназ при введенні атропіну в більшій мірі пов'язано саме із змінами вмісту стероїдних гормонів та цАМФ, а не з його холінолітичною дією. Це припущення базується на результатах досліджень впливу ваготомії на систему мікосомального окислення печінки. В наших дослідках показано (мал. 6), що за умов ваготомії у дорослих та старих щурів вміст цитохрому P-450 суттєво не змінюється, а АГазна активність знижується. АПДазна активність при цьому зменшується у дорослих тварин та збільшується - у старих. Блокада холінергічних впливів приводить до зниження у дорослих тварин індуктивного синтезу мікосомальних монооксигеназ, що викликаний введенням ФЕ. У старих тварин цей ефект практично відсутній, що свідчить про послаблення холінергічних нервових впливів у старості.

Дослідження, які проведені, показують, що блокада різних ланцюгів синаптичної передачі справляє значний вплив на функціонування системи мікосомального окислення печінки. Звертає на себе увагу, що на фоні незначних змін концентрації цитохрому P-450

після ваготомії у дорослих та старих тварин суттєво знижується Аґаана активність; АПДаана активність зменшується у дорослих тварин та збільшується - у старих. Симпатотомія приводить до вираженого зниження концентрації цитохрому Р-450 у дорослих і старих шурів та різноспрямованих змін АПДааної та Аґааної активностей.

Для аналізу постденерваційних змін монооксигеназоної активності було проведено електрофоретичне розділення білків мікросом печінки дорослих та старих шурів. Проведені дослідження встановили (табл.3), що під впливом ваготомії у дорослих шурів збільшується вміст ізоформи цитохрому Р-450 з м.м. 50 та 54 кД, а у старих тварин - тільки ізоформ з м.м. 54 кД, до того ж в меншій мірі, ніж у дорослих. Симпатотомія супроводжується підвищенням відносного вмісту гемопротеїдів з м.м. 50, 54 та 56 кД у дорослих тварин, а у старих - ізоформ цитохрому Р-450 з м.м. 51 та 52 кД. При цьому у старих шурів суттєво зменшуються ізоформи з м.м. 54 та 56 кД.

Під впливом триденного введення ФБ у дорослих тварин збільшується відносний вміст білків з м.м. 50 та 51 кД та зменшується - в ділянці 54-58 кД. У старих шурів ці зміни виражені значно менше - відмічається лише приріст площини поліпептидів з м.м. 50 кД. Введення ФБ на фоні ваготомії у дорослих шурів супроводжується менш вираженим приростом вмісту ізоформ з м.м. 50 та 51 кД, зменшений також і приріст вмісту ізоформ з м.м. 50 кД в умовах симпатотомії, а вміст ізоформ з м.м. 51 кД при цьому не змінюється. У старих тварин в умовах симпато- та ваготомії при введенні ФБ профілі розподілу поліпептидних смуг на денситограмах достовірно не змінюються. Електрофоретичний аналіз свідчить про те, що зміни моно оксигеназоної активності мікросом при денервації печінки пов'язані із змінами ізоформного складу цитохрому Р-450. Дослідження, які проведені, свідчать, що регуляція процесів мікросом-

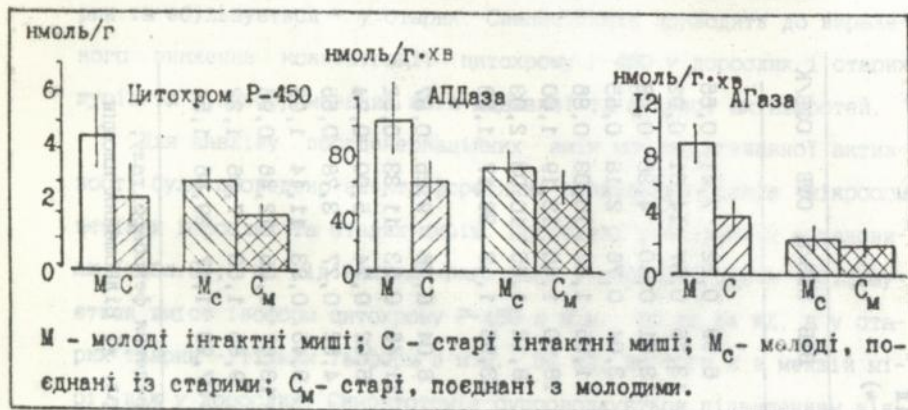
Таблиця 3

Вплив денервації печінки та введення ФБ на розподіл ізоформ цитохрому Р-450 у дорослих та старих щурів *)

Мм, кді	К	В	В/К	С	С/К	ФБ	ФБ/К	ВФБ	ВФБ/К	СФБ	СФБ/К
Д о р о с л і :											
58	11,35	8,19	0,72	11,47	1,01	6,91	0,61	6,99	0,62	7,41	0,65
56	15,80	18,33	1,19	19,61	1,24	11,21	0,71	13,75	0,87	14,61	0,92
55	9,08	8,37	0,92	7,58	0,84	3,65	0,40	3,61	0,40	4,36	0,48
54	3,97	7,85	0,98	6,84	1,72	2,61	0,66	3,04	0,76	2,18	0,55
52	11,73	14,47	1,23	10,17	0,87	9,12	0,78	11,95	1,02	10,03	0,86
51	13,24	9,42	0,71	10,45	0,79	21,38	1,62	18,60	1,40	13,19	1,00
50	4,92	7,85	1,60	8,14	1,65	11,21	2,28	8,12	1,65	10,03	2,03
48	29,89	25,02	0,88	25,71	0,86	33,90	1,13	33,93	1,13	38,17	1,28
С т а р і :											
58	10,65	10,27	0,96	7,77	0,73	8,85	0,83	8,04	0,76	9,25	0,87
56	21,68	24,40	1,12	20,25	0,92	12,20	0,56	11,46	0,53	11,33	0,52
55	6,79	5,87	0,86	4,36	0,64	4,72	0,70	5,02	0,74	5,00	0,74
54	5,84	7,52	1,29	2,35	0,40	4,42	0,76	4,52	0,77	3,78	0,65
52	10,18	9,54	0,94	13,42	1,32	9,44	0,93	9,45	0,93	11,14	1,09
51	13,00	14,68	1,13	17,20	1,32	12,98	1,00	13,67	1,05	12,46	0,96
50	6,03	7,15	1,19	6,59	1,09	9,83	1,63	9,85	1,63	7,36	1,22
48	25,82	20,55	0,80	28,03	1,08	37,56	1,46	37,99	1,47	39,66	1,54

К - контроль; В - ваготомія; С - симпатотомія; ФБ - введення фенобарбіталу; ВФБ - ваготомія + ФБ; СФБ - симпатотомія + фенобарбітал. *) Відношення площин окремих поліпептидів до загальної площини (%).

Вплив гетерохронного парабіозу на активність ферментів мікросомального окислення печінки мишей.



Мал.7.

мального окислення знаходиться під контролем симпатичної та парасимпатичної нервової системи, забезпечуючих підтримання певного рівня мікросомальних монооксигеназ. Послаблення при старінні нервового контролю над метаболічними процесами може приводити до порушення регуляції окремих ланок системи мікросомального окислення печінки, змін субстратної специфічності цитохрому Р-450, зниження адаптаційних можливостей.

Поряд з послабленням нервового контролю, суттєвий внесок у зниження активності детоксикаційних процесів в печінці при старінні роблять порушення гуморальної регуляції. Про це свідчать результати вивчення впливу гетерохронного парабіозу на активність мікросомального окислення в печінці. Було встановлено, що у молодих та старих парабіонтів знижуються вміст цитохрому Р-450, АЛаз та АЛДаз активності мікросом печінки у порівнянні із значеннями у контрольних поодиноких тварин (мал.7). Зниження вмісту цитохрому Р-450 та монооксигеназних активностей у молодих мишей було виражено в більшій мірі, ніж у старих тварин. Цілком імовірно,

що в крові старих мишей присутні гуморальні чинники, що справляють пригнічуючий вплив на мікросомальну детоксикаційну систему. За умов гетерохронного парабіозу на фоні зниженої активності мікросомальних ферментів у молодих та старих парабіонтів дія цих чинників приводить до того, що показники активності монооксигеназної системи молодих парабіонтів наближуються за значеннями до величин у старих поодиноких контрольних тварин. Дані, які отримані, угоджуються із заключенням про те, що результатом гетерохронного парабіозу являється "постаріння" печінки молодого партнера [H.Tauchi, K.Nasewaga, 1977].

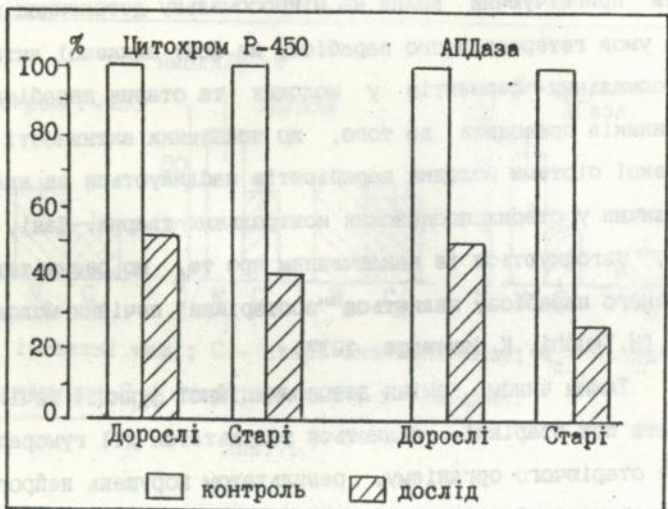
Таким чином, зміни детоксикаційної функції печінки, що настають при старінні, являються результатом дії гуморальних факторів старіючого організму, результатом порушень нейрогуморального контролю над функцією органів та тканин.

Система нейрогуморальної регуляції особливо активується в умовах стресу. Для з'ясування вікових особливостей нейрогуморальної регуляції детоксикаційної функції печінки нами було проведено вивчення впливу ЕВС на активність ферментів мікросомального окислення.

Дослідження, які були проведені, показали, що тривалий, протягом двох діб, ЕВС супроводжується різким зниженням вмісту цитохрому Р-450 та АПДазної активності мікросом (мал.8). Це зниження було особливо вираженим у старих тварин та приводило до їх загибелі (смертність 83 %) при введенні стандартної дози пентобарбіталу-натрію, яка застосовується для вивчення тривалості наркотичного сну.

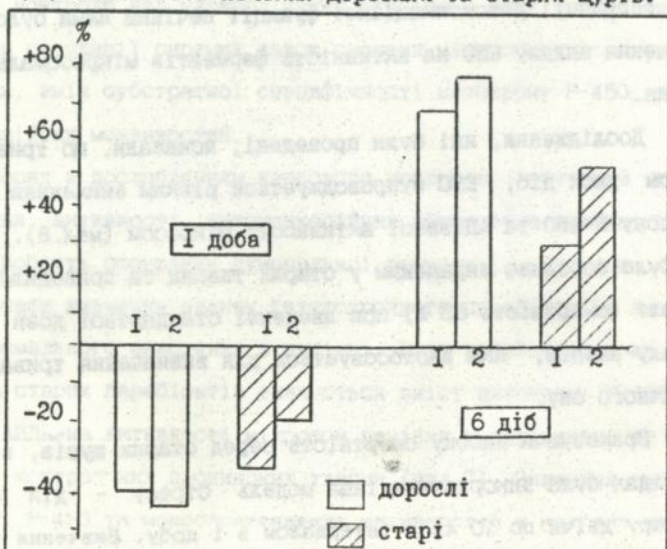
Враховуючи високу смертність серед старих щурів, в подальших дослідках була використана інша модель стресу - дія стресового фактору двічі по 10 хв в інтервалом в 1 добу. Вивчення тривалості наркотичного сну показало, що двократний стрес приводить через

Вплив тривалого ЕБС на ферменти мітросомального окислення печінки дорослих та старих щурів.



Мал.8

Вплив ЕБС на вміст цитохрому Р-450 /1/ та АЛДіазну /2/ активність печінки дорослих та старих щурів.



Мал.9

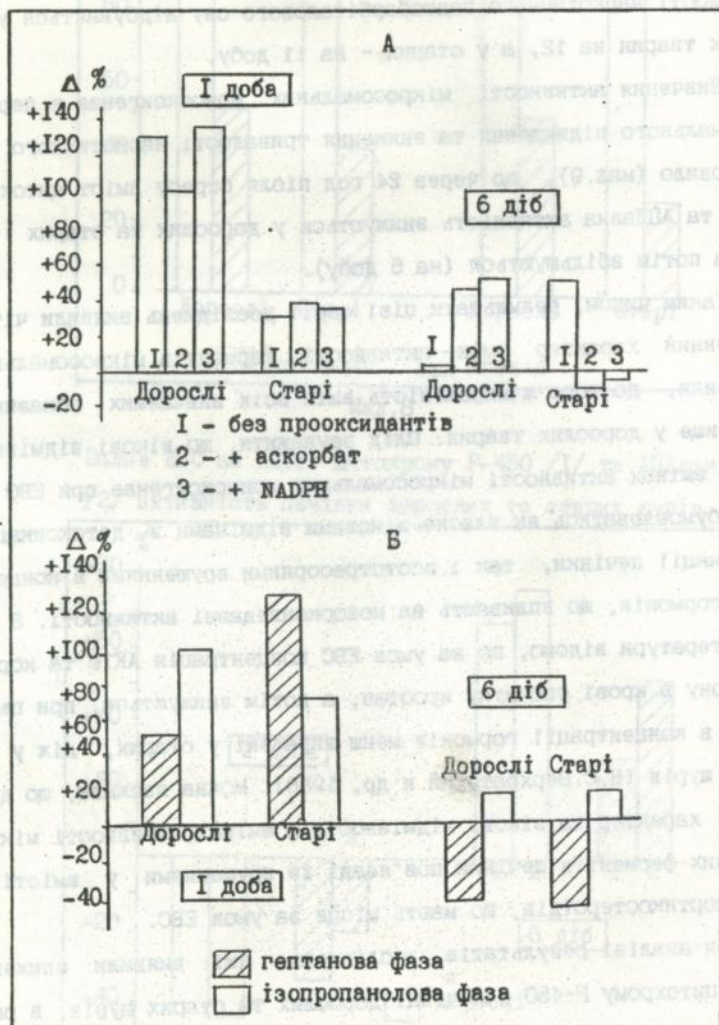
24 год до підвищення цього показника на 71 % у дорослих щурів та на 21 % - у старих. Через 4 доби після ЕБС тривалість сну відновлюється до вихідного рівня, а потім знижується (на 6 добу) у дорослих щурів на 32 %, а у старих - на 20⁰ %. Відновлення показника тривалості наркотичного пентобарбіталового сну відбувається у дорослих тварин на 12, а у старих - на 11 добу.

Вивчення активності мікосомальних монооксигеназ в періоди максимального підвищення та зниження тривалості наркотичного сну встановило (мал.9), що через 24 год після стресу вміст цитохрому P-450 та АПДана активність знижуються у дорослих та старих тварин, а потім збільшуються (на 6 добу).

Таким чином, результати цієї серії досліджень виявили чіткий двофазний характер змін активності ферментів мікосомального окислення, до того ж вираженість змін всіх вивчаємих показників була вище у дорослих тварин. Слід зауважити, що вікові відмінності в змінах активності мікосомальних монооксигеназ при ЕБС можуть обумовлюватись як власне віковими відмінностями в детоксикаційній функції печінки, так і постстресорними зрушеннями в концентрації гормонів, що впливають на монооксигеназні активності. З даних літератури відомо, що за умов ЕБС концентрація АКТГ та кортикостерону в крові спочатку зростає, а потім знижується, при цьому зміни в концентрації гормонів менш виражені у старих, ніж у дорослих щурів [Н.С.Верхратский и др, 1988]. Можна вважати, що двофазний характер та вікові відмінності в змінах активності мікосомальних ферментів печінки пов'язані із зрушеннями у вмісті в крові кортикостероїдів, що мають місце за умов ЕБС.

При аналізі результатів досліджень, які виявили зниження вмісту цитохрому P-450 в печінці дорослих та старих щурів, в ранні строки після стресу, необхідно враховувати, що цитохром P-450 являє собою мембранозв'язаний фермент, та його активність зале-

Вплив ЕБС на ПОЛ в мікосомах печінки дорослих та старих щурів. А - накопичення МДА, Б - вміст дієнових кон'югатів.



Мал. 10

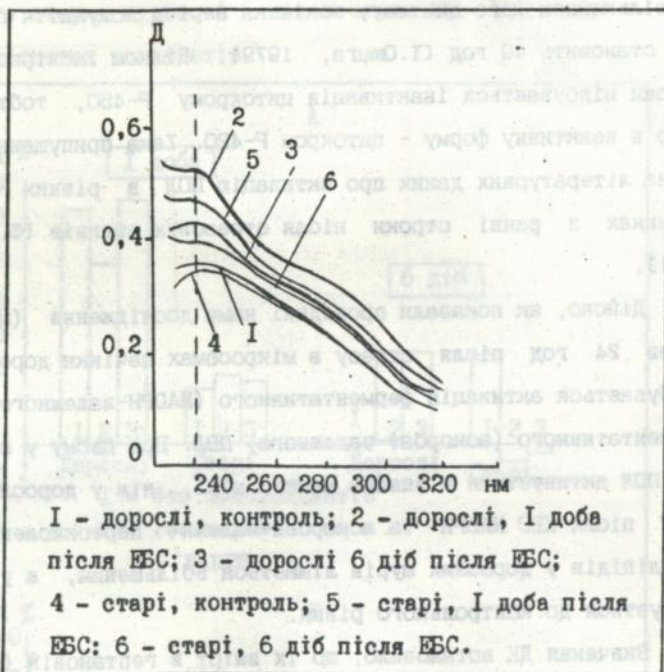
жить від мікрооточення в ліпідному бішарі. Зниження вмісту цитохрому Р-450 через 24 год після стресу не може бути пов'язаним з уповільненням його синтезу, оскільки період полужиття гемопротейду становить 40 год [Т.Омга, 1979]. Цілком імовірно, що в ці строки відбувається інактивація цитохрому Р-450, тобто перехід його в неактивну форму - цитохром Р-420. Таке припущення базується на літературних даних про активацію ПОЛ в різних органах і тканинах в ранні строки після стресових впливів [Ф.З.Меерсон, 1981].

Дійсно, як показали проведені нами дослідження (мал.10 А), через 24 год після стресу в мікросомах печінки дорослих щурів відбувається активація ферментативного (NADPH-залежного) та неферментативного (аскорбат-залежного) ПОЛ. При цьому у старих тварин ПОЛ активується в значно меншій мірі, ніж у дорослих. На 6 добу після ЕВС NADPH- та аскорбат-залежне переокислення мембранних ліпідів у дорослих щурів лішається збільшеним, а у старих - знижується до контрольного рівня.

Вивчення ДК встановило, що їх вміст в гептановій (нейтральні ліпіди) та ізопропаноловій (фосфоліпіди) фазах у дорослих та старих щурів через 1 добу після ЕВС збільшувався, а на 6 добу - знижувався (мал. 10 В). Відмінності в ступені змін вмісту ДК в різних фазах ліпідного екстракту мікросом печінки дорослих та старих тварин, які спостерігались, можуть бути пов'язаними з віковими порушеннями структури мембран ендоплазматичного ретикулу: змінами у властивостях ліпідного бішару та здатності різних класів ліпідів до реагування з гідрофобними та гідрофільними речовинами.

Ці дані підтвержені також результатами УФ-спектрофотометрії. Проведені дослідження показали (мал.11) збільшення в УФ-спектрах поглинання суспензій мікросом печінки - D₂₃₃-максиму-

Спектри поглинання в УФ-ділянці препаратів мітросом печінки щурів після ЕБС

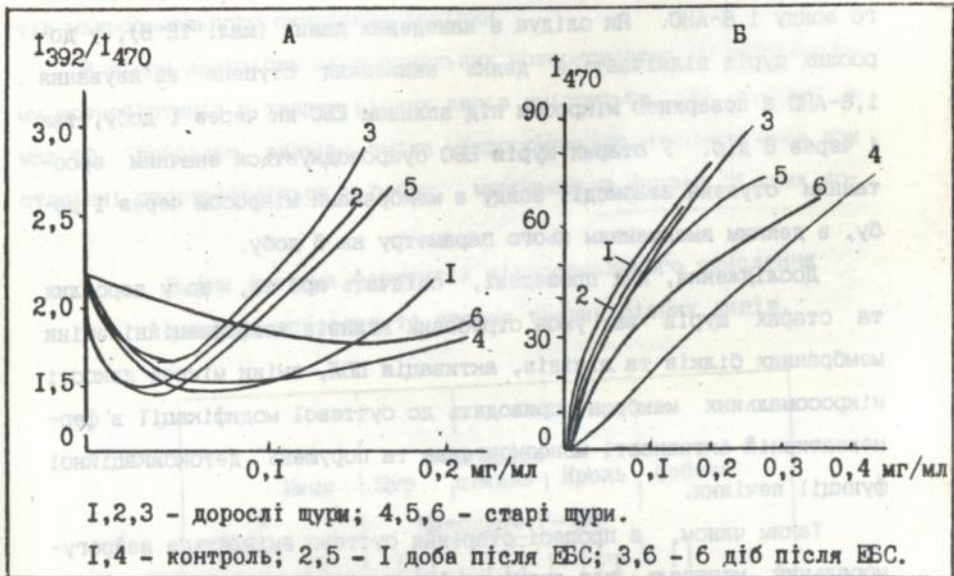


Мал. II

му, характерного для ДК, у дорослих та старих тварин через 1 добу після ЕБС; ці зміни були незначно виражені на 6 добу.

Вільно-радикальне ПОЛ, що активується в біомембранах в умовах ЕБС, супроводжується суттєвими змінами ферментативних властивостей, білок-ліпідних взаємодій та конформації мембранних білків. Дослідження, які проведені, показали, що в умовах ЕБС відмічаються зміни як положення максимуму, так і напівширини смуги власної флуоресценції мітросомальних білків. У дорослих тварин через 6 днів, а у старих - через 1 та 6 днів після ЕБС виявлено

Зміни параметрів I_{392}/I_{470} у флуоресцентному спектрі пірену /А/ та інтенсивності флуоресценції I,8-АНС /Б/ в залежності від концентрації мікосомального білку в печінці дорослих та старих щурів після ЕБС.



Мал.12

збільшення напівширини даної смуги флуоресценції, що овідчить про суттєві конформаційні зрушення білків мікосомальних мембран. Під впливом ЕБС відбувається також зниження інтенсивності власної флуоресценції білків мікосом печінки дорослих та старих щурів, найбільш виражене через 1 добу після ЕБС, яке дещо нормалізується на 6 добу.

Застосування флуоресцентного зонду пірену показало (мал.12 А), що ЕБС приводить до значного підвищення мікров'язкості гідрофобної фази мембран мікосом печінки. Так, у дорослих щурів через 1 добу після ЕБС мікров'язкість мембран різко збільшується і залишається на такому рівні на 6 добу. У старих тварин через 1 добу

мікрів'язкість також зростає, але на 6 добу в значній мірі знижується, наближаючись до норми.

Вивчення змін поверхневого потенціалу мембран мікросом печінки в умовах ЕВС було проведено із застосуванням флуоресцентного зонду 1,8-АНС. Як слідує з наведених даних (мал. 12 В), у дорослих щурів відмічається деяке зниження ступеня зв'язування 1,8-АНС з поверхнею мікросом під впливом ЕВС як через 1 добу, так і через 6 діб. У старих щурів ЕВС супроводжується значним зростанням ступеня взаємодії зонду з мембранами мікросом через 1 добу, з деяким зменшенням цього параметру на 6 добу.

Дослідження, які проведені, свідчать про те, що у дорослих та старих щурів за умов стресових впливів конформаційні зміни мембранних білків та ліпідів, активація ПОЛ, зміни мікрів'язкості мікросомальних мембран приводять до суттєвої модифікації в ферментативній активності монооксигеназ та порушень детоксикаційної функції печінки.

Таким чином, в процесі старіння суттєво змінюється нейрогуморальний контроль над системою ферментів мікросомального окислення, і ця обставина приводить до того, що в умовах напруженої діяльності, зокрема, в умовах стресу, знижується захисна детоксикаційна роль мікросомальних монооксигеназ. Зменшення діапазону адаптації ферментів мікросомального окислення в умовах функціональних навантажень може справляти суттєвий вплив на ТЖ.

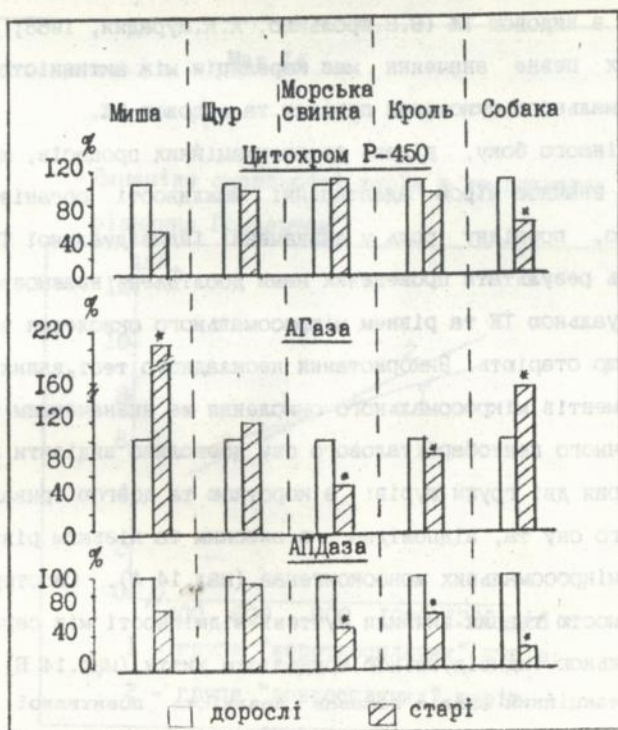
Вікові зміни ферментів мікросомального окислення
печінки у тварин з різною видовою та індивідуальною
тривалістю життя

Виходячи з того, що система ферментів мікросомального окислення печінки являє собою важливу ланку в регуляції метаболічних процесів в організмі, вважалось за доцільне співставити зрушення в активності мікросомальних монооксигеназ із змінами в ТЖ.

Нами було проведено вивчення змін активності ферментів мікросомального окислення печінки при старінні тварин з різною видовою ТЖ - мишей, щурів, морських свинок, кролів та собак. Були встановлені міжвидові відмінності у вмісті та активності ферментів мікросомального окислення печінки.

З віком адатність мікросомальних монооксигеназ до метаболізму ксенобіотиків у тварин різних видів змінюється. Як слідує з мал.13, найбільш значимі зміни мікросомальних монооксигеназ при старінні спостерігаються у собак, максимальна видова ТЖ яких до-

Зміни системи ферментів мікросомального окислення печінки дорослих та старих тварин різних видів.



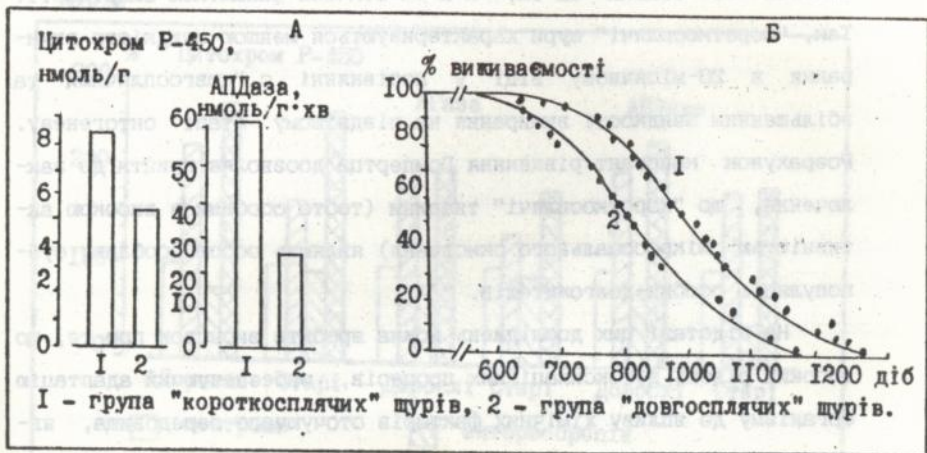
рівнює 20 рокам. Крім того, у собак в старості мають місце значні зміни субстратної специфічності цитохрому P-450 - зниження здатності до N-деметиловання амінопіріну та підвищення активності гідроксилювання аніліну. У відповідності з концепцією В.В.Фролькіса [1981], вікові зміни належать до хронобіологічних, тобто таких, що залежать від ТЖ і тим значніше виражені, чим більше вікова ТЖ.

Проведений нами кореляційний аналіз виявив наявність негативною кореляції між максимальною ТЖ тварин та активністю мікросомальної АПД:ази ($r = -0,796$; $p < 0,02$) та ступенем зниження цього показника при старінні ($r = -0,893$; $p < 0,01$).

В даний час накопичений достатній фактичний матеріал, що свідчить про існування багатьох метаболічних показників, які корелюють з видовою ТЖ [В.В.Фролькіс, Х.К.Мурадян, 1988; 1992]. Серед них певне значення має кореляція між активністю ферментів мікросомального окислення печінки та видовою ТЖ.

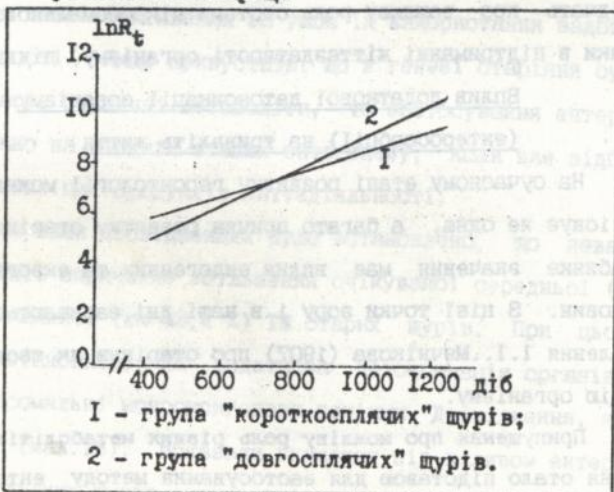
З іншого боку, рівень детоксикаційних процесів, що характеризують значною мірою адаптаційні можливості організму, грає, очевидно, провідну роль у визначенні індивідуальної ТЖ. Про це свідчать результати проведених нами досліджень взаємозв'язку між індивідуальною ТЖ та рівнем мікросомального окислення в печінці у щурів, що старіють. Використання нескладного тестування активності ферментів мікросомального окислення за визначенням тривалості наркотичного пентобарбіталового сну дозволило виділити з популяції тварин дві групи щурів: з короткою та довгою тривалістю наркотичного сну та, відповідно - з високим та низьким рівнем активності мікросомальних монооксигеназ (мал.14 А). Спостереження за виживаемістю тварин виявили суттєві відмінності між середньою та максимальною індивідуальною тривалістю життя (мал.14 Б). Проведений кореляційний аналіз показав наявність позитивної кореляції

Вплив активності мікросомального окислення в печінці на індивідуальну тривалість життя щурів.



Мал.14

Динаміка смертності щурів в координатах рівняння Гомпертца



Мал.15

між активністю мітросомальних монооксигеназ та індивідуальною ТЖ старих тварин. Як видно з мал.15, тварини дослідних груп розрізняються не тільки за ТЖ, а й за віковою динамікою смертності. Так, "короткоспльахі" шури характеризуються меншою швидкістю вимирання в 20-місячному віці у порівнянні с "довгоспльахими" та збільшенням швидкості вимирання на пізнішому етапі онтогенезу. Розрахунок констант рівняння Гомпертца дозволяє прийти до заключення, що "короткоспльахі" тварини (тобто особини з високою активністю мітросомального окислення) являють собою особливу субпопуляцію особин-довгожителів.

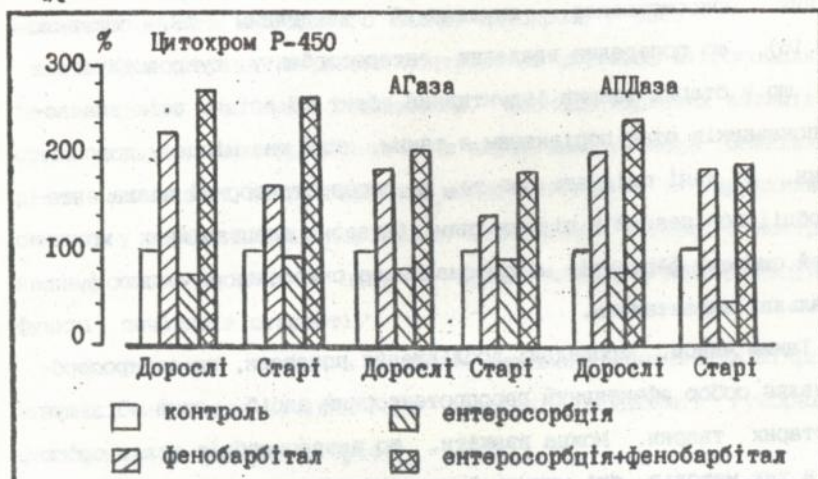
На підставі цих досліджень можна зробити висновок про те, що високий рівень детоксикаційних процесів, забезпечуючий адаптацію організму до впливу хімічних факторів оточуючого середовища, являється, можливо, одним з важливих механізмів вітаукта (В.В.Фролькіс, 1981), які направлені на підтримання життєдіяльності та забезпечення високої індивідуальної ТЖ. Високий рівень детоксикаційних процесів являє собою, можливо, одну з причин довгожителства у людей (Н.Н.Чапаєва и др., 1986). Ці дослідження свідчать про важливу роль системи мітросомального окислення печінки в підтриманні життєдатності організму, підвищенні ТЖ.

Вплив додаткової детоксикації організму
(ентеросорбції) на тривалість життя

На сучасному етапі розвитку геронтології можна стверджувати, що існує не одна, а багато причин розвитку старіння і серед них неабияке значення має вплив ендогенних та екзогенних токсичних речовин. З цієї точки зору і в наші дні залишаються актуальними уявлення І.І.Мечнікова (1907) про старіння як своєрідну інтоксикацію організму.

Припущення про можливу роль рівних метаболітів в генезі старіння стало підставою для застосування методу ентеросорбції для

Вплив ентеросорбції на індуктивний синтез ферментів мітросомального окислення печінки дорослих та старих щурів



Мал. 16

додадкової детоксикації організму з метою пролонгування життя. Всі відомі до цього часу експериментальні методи пролонгування життя показували себе ефективними за умов їх використання задовго до настання старості. Якщо припустити, що в генезі старіння суттєве значення мають токсичні метаболіти, то застосування ентеросорбції виправдано на пізніх етапах онтогенезу, коли вже відбувається накопичення цих продуктів життєдіяльності.

В проведених нами дослідженнях було встановлено, що певний режим ентеросорбції спричиняє збільшення очікуваної середньої (на 47,3 %) та максимальної (на 43,4 %) ТЖ старих щурів. При цьому важливо було встановити, як додаткова детоксикація організму впливає на мітросомальні монооксигенази печінки. Дослідження, які були проведені (мал.16), показали зниження під впливом ентеросорбції у піддослідних щурів активності мітросомальних монооксигеназ, що пов'язано, очевидно, із зменшенням концентрації в крові

токсичних речовин, які являються субстратами ферментів мікросомального окислення та ендогенними індукторами цитохрому P-450.

Вивчення впливу ентеросорбції на індуктивний синтез мікросомальних монооксигеназ, викликаний введенням ФБ, показало (мал.16), що попереднє введення ентеросорбенту супроводжується тим, що у старих тварин індуктивний ефект ФБ агідно всіх вивчаємих показників стає порівняним з таким, який має місце у дорослих тварин. Ці дані свідчать про те, що геропротекторний вплив ентеросорбції пов'язаний з підвищенням діапазону адаптаційних можливостей системи ферментів мікросомального окислення в умовах функціональних навантажень.

Таким чином, проведені дослідження показали, що ентеросорбція являє собою ефективний геропротекторний засіб, який збільшує ТЖ старих тварин. Можна вважати, що ентеросорбція являє собою один з тих методів, які можуть бути рекомендовані для їх використання у людини.

ВИСНОВКИ.

1. При старінні змінюється ізоформний склад цитохрому P-450 та фізико-хімічні властивості мембран ендоплазматичного ретикулу-му гепатоцитів.

2. В умовах функціональних навантажень у старих тварин порушується синтез окремих ізоформ цитохрому P-450, що супроводжується своєрідним вичерпанням монооксигеназної активності. При старінні збільшується латентний період дії індуктору та знижується індуктивний ефект, що свідчить про зменшення адаптаційних можливостей мікросомальної детоксикаційної системи.

3. При старінні змінюється внутрішньоклітинна регуляція індуктивного синтезу ферментів мікросомального окислення печінки, що опосередкована станом плазматичних мембран гепатоцитів.

4. Система ферментів мікросомального окислення печінки зна-

ходиться під контролем нервової регуляції, і фармакологічна блокада адрен- та холінергічних нервових імпульсів, а також хірургічна денервація печінки приводять до змін активностей мітросомальних монооксигеназ та ізоформного складу цитохрому Р-450.

5. При старінні нервовий контроль за системою мітросомального окислення печінки послаблюється. Блокада нервових впливів у старих тварин супроводжується менш вираженими змінами базального рівня активності мітросомальних монооксигеназ та їх індуктивного синтезу у порівнянні із дорослими. Послаблення нервового контролю являє собою, можливо, одну з причин зниження детоксикаційної функції печінки в старості.

6. Суттєвий внесок в зниження активності ферментів мітросомального окислення печінки при старінні справляють гуморальні фактори організму, що старіє.

7. Тривалий ЕВС приводить до рівного зниження вмісту та активності ферментів мітросомального окислення, особливо вираженого у старих тварин, що приводить до збільшення їх смертності при надходженні субтоксичних доз коензотиків. За умов помірних стресових впливів опостерігається двофазний характер змін мітросомальних монооксигеназ печінки - слідом за зниженням їх функціональної активності настає підвищення, що характеризує фазу адаптації.

8. Зміна у вмісті та активності мітросомальних монооксигеназ в різні строки після стресу супроводжується відмінностями спонтанного, ферментативного та неферментативного ПОЛ, накопиченням дієвоних кон'югатів та модифікацією мембран ендоплазматичного ретикулуму - конформаційними зрушеннями білкових молекул, порушенням білок-ліпідних взаємодій, підвищенням мікрів'язкості ліпідного бішару та змінами поверхневого заряду мембрани.

9. Зміни вмісту цитохрому Р-450, монооксигеназної активнос-

ті, ПОЛ та фізико-хімічних властивостей мітросомальних мембран після стресу були більш виражені у дорослих тварин, що свідчить про зниження адаптаційних можливостей системи ферментів мітросомального окислення в старості.

10. Вікові зміни активності ферментів мітросомального окислення печінки у тварин різних видів належать до хронобіологічних, тобто залежать від ТЖ життя та тим більше виражені, чим вище відрод ТЖ.

11. Виявлена позитивна кореляція між індивідуальною ТЖ та активністю ферментів мітросомального окислення печінки. Високий рівень детоксикаційних процесів, що забезпечують адаптацію організму до впливу хімічних факторів оточуючого середовища, являє собою один з механізмів вітаукту, направлених на підтримання життєдіяльності та забезпечуючих високу індивідуальну ТЖ.

12. Додаткова детоксикація організму старих тварин за допомогою ентеросорбції приводить до збільшення середньої та максимальної ТЖ. Геропротекторний ефект ентеросорбції пов'язаний із підвищенням діапазону адаптаційних можливостей системи ферментів мітросомального окислення в умовах функціональних навантажень, що виявляється збільшенням індуктивного синтезу монооксигеназ у старих тварин після ентеросорбції.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

Монографії:

1. Principles for evaluating chemical effects on the aged population. World Health Organization, Geneva, 1993. - 159 p. (with V.N. Anisimov, L.S. Birnbaum, G. Butenko et al.)

Статті:

2. Энтеросорбция как метод увеличения продолжительности жизни старых животных // Физиол. ж. АН УССР. - 1984. - 30, N 1. - С. 30-39 (соавт. В.В. Фролькис, В.Г. Николаев, Л.Н. Богдацкая и др.).

3. Enterosorption in prolonging old animal lifespan // Exp. Gerontol. - 1984. - 19, N 4. - P. 217-225 (with V.V. Frolkis, V.G. Nikolaev, L.N. Bogatskaya et al.).

4. Влияние энтеросорбции на сигналы ЭП печени крыс разного возраста // Вопр. мед. химии. - 1985. - 32, N 3. - С. 79-81. (соавт. В.К. Кольтовер, В.В. Фролькис, Е.Н. Горбань, Е.В. Щербицкая).

5. Влияние фенобарбитала на систему микросомального окисления печени крыс разного возраста // В сб.: "Фармакология и токсикология". - 1986. - С. 56-59.

6. Enterosorption geroprotective characteristics // In: Progress in Artificial Organs /Eds. Nose Y., Kiellstrand J., Ivanovich P./ Cleveland: ISAO Press, 1986. - P. 758-759 (with E.V. Shoherbitskaya, V.V. Frolkis, V.G. Nikolaev et al.).

7. Влияние гиперполяризации плазматической мембраны на состояние хроматина и биосинтез белка гепатоцитов крыс разного возраста // Докл. АН УССР. - Серия Б. - 1987. - 3. - С. 79-81 (соавт. В.В. Фролькис, Н.В. Гольдштейн).

8. Оксигеназные реакции в микросомах печени крыс при антиоксидантной недостаточности // Докл. АН УССР. - Серия Б. - 1987. - 2. - С. 72-74 (соавт. Ю.И. Губский, О.В. Задорина).

9. Структурные изменения в гипофизе и коре надпочечников мышей при гетерохронном парабозе // В сб.: Вопросы геронтологии. вып.

10. "Эндокринные механизмы старения и возрастной патологии". Киев, 1988. - С. 68-74 (соавт. В.М. Шапошников).

10. Оксигеназные реакции в микросомах печени крыс в условиях антиоксидантной недостаточности // Вопр. мед. химии. - 1988. - 34, N 4. - С. 81-85 (соавт. Ю.И. Губский, О.В. Задорина, Л.Г. Сударикова, Т.П. Прадий).

11. Перекисное окисление мембранных липидов и транспорт кальция в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов // Молекулярная генетика и биофизика. - Киев: "Вища школа", 1988. - Вып. 13. -

С. 64-69.

12. Plasma membrane hyperpolarization effect on chromatin and protein biosynthesis state in rat hepatocytes of different ages // Z. Alternsforsch. - 1989. - N 44/1. - P. 3-5 (with V.V.Frolkis, N.B.Goldshtein).

13. Effect of enterosorption on animal lifespan // Biomaterials, artificial cells, and artificial organs. - 1989. - 17, N 3. - P. 341-351 (with V.V.Frolkis, V.G.Nikolaev, E.V.Shcherbitskaya et al.)

14. Система микросомального окисления печени при старении животных с различной видовой продолжительностью жизни // Журнал общей биологии. - 1989. - 50, N 6. - С. 789-793.

15. Связь интенсивности микросомального окисления печени с индивидуальной продолжительностью жизни // Бюлл.эксперим.биол. и мед. - 1989. - 57, N 6. - С. 743-745.

16. Влияние денервации печени на систему микросомального окисления взрослых и старых крыс // Физиол. ж. УССР. 1990. - 36, N 6. - С. 84-89.

17. Микросомальное окисление лекарственных веществ в печени при старении // Проблемы старения и долголетия. - 1991. - 1, N 2. - С. 192-203.

18. Cytochrome P-450 catalytic activity and isoform composition following liver denervation in old male rats // Arch.Gerontol. and Geriatr. - 1992. - 15. - P. 1-11 (with V.V.Frolkis).

19. Перекисная модификация мембран и изоформный состав цитохрома P-450 микросом печени крыс в условиях антиоксидантной недостаточности // Укр.биохим.журн. 1992. - 64, N 1. - С. 98-105 (соавт. Ю.И.Губский, А.Е.Волдескул, Л.А.Богданова).

20. Инверторный механизм изменения состояния плазматических мембран гепатоцитов при индукции микросомальных монооксигеназ у взрослых и старых крыс // Бюлл.эксперим.биол. и мед., 1994. - 62, N 1. - С. 13-15 (соавт. В.В.Фролькис, А.Л.Кобаарь).

21. Влияние стресса на систему микросомального окисления в печени взрослых и старых крыс // Докл. АН Украины, серия Б. - N 4. - С. 67-70.

22. Способ определения предстоящей продолжительности жизни лабораторных крыс // А.с. N 1508153 по заявке N 4249924/28 от 26.05.87. (Бюлл. Открытия и изобретения, 1989. - 34. - С.200).

23. Возрастные особенности индуктивного синтеза ферментов микросомального окисления печени при длительном введении фенобарбитала

// Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 1985. - 54, N 8 (Деп. ВИНТИ).

Теги наукових доповідей:

24. Генетическая индукция ферментов микросомального окисления печени в старости // II Симп. "Цитогенетика старения". Тбилиси, 1984. - С. 102.

25. Влияние длительного введения фенобарбитала на активность монооксигеназы печени взрослых и старых крыс // V Укр. съезд фармакологов. Запорожье, 1985. - С. 78.

26. Энтеросорбция как возможный геропротектор // III Сессия научного совета по проблеме "Гемосорбция". Запорожье, 1985. - С. 92 (соавт. В.В.Фролькис, Е.В.Щербицкая, Л.Н.Вогачкая и др.).

27. Влияние энтеросорбции на систему ферментов микросомального окисления печени старых крыс // Там же. - С. 45 (соавт. Е.В.Щербицкая).

28. Влияние длительной функциональной нагрузки на микросомальную детоксикационную систему печени взрослых и старых крыс // Конф., посв. памяти Г.В.Фольборта. Черкассы, 1985. - С. 100.

29. Сигналы ЭПР печени крыс при энтеросорбции // Всесоюз. конф. "Методы спектроскопии в биохимии и медицине". Москва, 1985. - С. 98 (соавт. В.В.Фролькис, В.К.Кольтовер, Е.Н.Горбань, Е.В.Щербицкая).

30. Индукция микросомального цитохрома P-450 в печени крыс при старении // Всесоюз. симп. "Цитохром P-450 и охрана внутр. среды человека". Москва, 1985. - С. 121-122.

31. Effect of geroprotective regimen of enterosorption on some biochemical indexes in old rats // 7th Intern. Simp. of htmoperfusion. Kiev, 1986. - P. 95 (with V.E.Sabko, E.V.Sherbitskaya).

32. Effect of enterosorption on animal lifespan // 7th Intern.Symp. of hemoperfusion. Canada, 1986. - P. 285-295 (with V.V.Frolkis, V.G.Nikolaev, E.V.Sherbitskaya et al.).

33. Функциональний стан печінки старих та дорослих щурів при ентеросорбції // XII Укр. з'їзд фізіологів. Львів. - 1985. - С. 78. (соавт. О.В.Щербицка, Х.К.Мурадян, С.М.Новікова та ін.).

34. Возрастные особенности изменения чувствительности животных к барбитуратам // Всесоюз. симп. "Нейрогуморальные механизмы старения". Киев. - 1986. - С. 199-200.

35. Влияние гетерохронного парабисоза на состояние системы гипоталамо-кора надпочечников и функцию печени у мышей // Там же. - С. 100-101 (соавт. В.В.Фролькис, В.М.Шалопников).

36. Возрастные особенности постденервационных изменений электрических реакций, биосинтеза белка и РНК в скелетной мышце и печени // XV Всесоюз. съезд физиол. общества. Кишинев, 1987. - С. 71 (соавт. С. А. Танин, В. В. Безруков, Х. К. Мурадян и др.).

37. Влияние адренергических блокаторов на содержание цитохрома P-450 печени взрослых и старых крыс // III Всесоюз. конф. "Цитохром P-450 и охрана окружающей среды". Новосибирск. - 1987. - С. 132.

38. Индукция множественных форм цитохрома P-450 печени крыс при старении // Там же. - С. 109 (соавт. А. И. Довгий, Н. В. Адрианов).

39. Особенности резистентности системы митохондриального окисления в старости // Всесоюз. конф. "Реактивность и резистентность". Киев, 1987. - С. - 117-118.

40. Влияние адреноблокаторов на реактивность тканей в старости // Там же. - С. 54-55 (соавт. Е. Н. Горбань).

41. Особенности адренергической регуляции в старости // Всесоюз. симп. "Молекулярн. и функциональн. механизмы онтогенеза", посв. памяти А. В. Нагорного. Харьков, 1987. - С. 54-55 (соавт. Е. Н. Горбань, Т. Ю. Лакиза).

42. Возрастные особенности реактивности системы ферментов митохондриального окисления печени при введении адреноблокаторов // I Съезд геронтологов и гериатров УССР. Днепропетровск, 1988. - С. 58.

43. Система ферментов митохондриального окисления печени и продолжительность жизни животных // V Всесоюз. съезд геронтологов и гериатров. Тбилиси, 1988. - С. 122.

44. Влияние денервации на ферменты митохондриального окисления печени взрослых и старых крыс // IV Всесоюз. съезд патофизиологов. Кишинев, 1989. - С. 553.

45. Влияние денервации печени на ферменты митохондриального окисления у взрослых и старых крыс // V Всесоюз. симп. "Цитохром P-450 и модификация макромолекул". Ялта, 1989. - С. 134.

46. Механизмы детоксикационного действия энтеросорбции у взрослых и старых крыс // Всесоюз. симп. "Гериатрические средства: эксперим. поиск и клинич. использование". Киев, 1990. - С. 48 (соавт. В. К. Кольтовер, Е. Н. Горбань).

47. Влияние альфа- и бета-адреноблокаторов на эндокринную систему и детоксикационную функцию печени при старении // Там же. - С. 128-129 (соавт. Е. Н. Горбань).

48. Ослабление нервного адренергического контроля в старости //

XIII З'їзд Укр. фізіол. товари. Харків, 1990. - С. 67-68 (співавт. Е.М.Горбань).

49. Neuro-humoral mechanisms of aging // The 4-th National Congr. of Geront. and Geriatr. Korea, 1990. - P. 19-20 (with V.V.Frolkis, E.N.Gorban, V.A.Matrenitskiy et al.).

50. Ферменты микросомального окисления печени взрослых и старых крыс при энтеросорбции // Респ.научно-практ. конф."Синтез и применение энтеросорбентов". Конаково, 1990. - С. 13 соавт. Е.Н.Горбань, В.К.Кольцовер).

51. The effect of liver denervation on microsomal oxidation activity in aging // 4th Asia/Oceania Regional Congr. of Gerontology. Yokohama, Japan, 1991. - P. 373.

52. Влияние индукции системы микросомального окисления на активность Na,K-АТФазы гепатоцитов крыс разного возраста // Симп. "Биологические механизмы старения". Харьков, 1994. - С. 117 (соавт. А.Л.Кобзарь).

53. Вплив стресу на монооксигеназну активність і перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) мікросом печінки дорослих і старих щурів // XIV З'їзд Укр.фізіол.товариства ім.І.П.Павлова. Київ, 1994. - С.343.

54. Возрастные особенности влияния стресса на ферменты микросомального окисления печени. // II Нац. конгр.геронтол.и герiatrics Украины. Киев, 1994.- С. 479.

The materials of 23 scientific reports and 1 paper, containing experimental data elucidating the process of age-dependent changes of the hepatic microsomal regulation of oxidation are defended. It is shown that the diminishing of microsomal monooxygenase activity in aging is accompanied by the cyclo-oxygenase P-450 isoform content and physico-chemical properties of membrane changes, nerve control reducing. The relationship between the hepatic detoxication function and life-span longevity is established.

Ключові слова: печінка, микросомальне окислення, ізоформи цитохрому P-450, стрес, регуляція окислення, довготривалість життя, старіння.

1007

Парамонова Г.И. Регуляция микросомального окисления в печени при старении (рукопись).

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. Институт геронтологии АМН Украины, Киев, 1994. Защищаются 53 научные работы и 1 авторское свидетельство, которые содержат экспериментальные данные о регуляции активности ферментов микросомального окисления печени. Показано, что снижение активности микросомальных монооксигеназ в старости связано с изменением изоформного состава цитохрома P-450, физико-химического состояния микросомальных мембран, ослаблением нервного контроля. Установлена взаимосвязь между активностью детоксикационных процессов в печени и продолжительностью жизни животных.

Paramonova G.I. Regulation of the microsomal oxidation in liver during aging (manuscript).

Doctor of Biological Sciences Dissertation (Speciality 03.00.04 - biochemistry). Institute of Gerontology of Ukrainian ANS, Kiev, 1994.

The materials of 53 scientific reports and 1 patent, containing experimental data elucidating the problem of age-dependent changes of the hepatic microsomal regulation oxidation, are defended. It is shown that the diminishing of microsomal monooxygenases activity in aging is accompanied by the cytochrome P-450 isoforms content and physico-chemical properties of membranes changes, nerve control reducing. The relationship between the hepatic detoxication function and life-span longevity is established.

Ключові слова: печінка, микросомальне окислення, ізоформи цитохрому P-450, стрес, тривалість життя, старіння, регуляція.

Гас

8987m

AB 32.034