

S. I. Pavlovich, I. N. Alekseyeva

CHANGES IN THE HISTOSTRUCTURE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE IMMUNOCOMPETENT ORGANS UNDER CONDITIONS OF DAMAGED PORTAL BLOOD SUPPLY OF THE LIVER

In CBA mice calibrated stenosis of the portal vein was produced. Liver and immunocompetent organs were morphologically analyzed. The total number of hemopoietic stem cells in the bone marrow was estimated by the colony-forming cells and in the spleen after immunization with sheep red cells by the plaque forming method. It is established that stenosis of the portal vein (on the average by 45 % and 58 %) produced the histostructural changes in the liver and in the immunocompetent organs. Expression of morphological changes depended on the time elapsed after operation and the degree of the portal vein stenosis. These changes were the most pronounced on the 16-17th day when stenosis of the portal vein was 58 %. The character of the changes in the number of the hemopoietic stem cells in the bone marrow and in that of antibody-forming cells in the spleen depended on the degree of the liver damage. These changes increased with the degree of the liver histostructure damage. The maximal liver damage was accompanied by a decrease of these indices.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровков С. А., Волкова М. И. Изменение активности некоторых ферментов при острых нарушениях печеночного кровотока // Патол. физиология и эксперим. терапия.— 1974.— Вып. 1.— С. 57—61.
2. Клейда В., Асеев В. Нарушение портального кровотока в экспериментальном моделировании патологии некоторых органов пищеварения // Актуальные проблемы лечения недостаточности почек: Тез. докл.— Тарту, 1986.— С. 53—54.
3. Леонтьев А. Ф., Чистова Л. В., Марков Б. А. и др. Диагностика редких форм блокады портального кровообращения у детей // VI Всероссийский съезд детских врачей: Краткие тезисы.— Горький, 1987.— С. 277—278.
4. Мухамеджанов И. А. О реакции печени кроликов на выключение воротного или артериального кровообращения // Изв. АН, отд. биол. наук АН Тадж ССР.— 1970.— 1 (58).— С. 74—76.
5. Салий М. Е., Юрченко И. И., Ультан Г. А. Случай первичного склероза воротной вены // Врачеб. дело.— 1987.— № 7.— С. 27—28.
6. Фишер А. Физиология и экспериментальная патология печени.— Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1961.— 216 с.
7. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody — producing cells // Science.— 1963.— 140, N 2.— P. 405.
8. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res.— 1961.— 14.— P. 213—222.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР,
Киев

Материал поступил
в редакцию 02.04.90

УДК 612.351.110.12:612.67

Г. И. Парамонова

Влияние денервации печени на систему микросомального окисления взрослых и старых крыс

Для выяснения роли возрастных изменений активности ферментов микросомального окисления печени в развитии старения важным является изучение механизмов регуляции этой системы на уровне целостного организма. Одним из подходов к выявлению нервного контроля над детоксикацией служит изучение сдвигов активности ферментов микросомального окисления при денервации печени [2, 5]. Комплексом работ Фролькиса и соавт. [12] показано, что при старении нервный контроль

© Г. И. ПАРАМОНОВА, 1990.

над органами и тканями ослабляется. Можно предположить, что изучение возрастных особенностей влияния денервации печени на систему микросомального окисления приблизит к пониманию роли вегетативной нервной системы в механизмах изменения детоксикации организма в старости.

Цель нашей работы — изучение влияния хирургической денервации печени на базальное и индуцированное фенобарбиталом содержание цитохрома Р-450, его каталитическую активность и изоформный состав у взрослых и старых крыс.

Методика

Работа выполнена на 150 крысах-самцах линии Вистар двух возрастных групп: взрослые (6—7 мес) и старые (26—27 мес). Денервацию печени осуществляли двусторонней перерезкой чревных нервов внебрюшинно, под диафрагмой, у входа в солнечное сплетение (частичная десимпатизация), и поддиафрагмальной стволовой ваготомией с перерезкой передней и задней ветвей блуждающих нервов и удалением их, по возможности, на большем протяжении. Контролем служили ложнопериованные животные. Операции проводили под пентобарбитальным наркозом (2,5 мг/100 г, внутривенно). Фенобарбитал натрия (8 мг/100 г, внутривенно) вводили ежедневно, в течение 3 сут, за трое суток до забоя. Через 7 сут после операции животных забивали декапитацией под эфирным наркозом, микросомы печени получали методом дифференциального центрифугирования [7]. Для освобождения от сорбированных белков фракцию микросом пересаживали в раствор пироглутамата натрия (100 ммоль/л). В микросомной фракции печени определяли концентрацию цитохрома Р-450 (нмоль/мг белка) [15], аминопириндеметилазную (нмоль формальдегида · мг⁻¹ · мин⁻¹) [1] и анилингидроксилазную (нмоль парааминофенола · мг⁻¹ · мин⁻¹) [7] активности. Содержание белка определяли методом Lowry [14] при наличии 5 % дезоксихолата натрия.

Электрофоретическое разделение белков микросом проводили по методу Laemmly [13], приспособленному к электрофорезу в пластинах геля. Гель длиной 20 см состоял из полиакриламида с градиентом концентрации от 5 до 15 %. После электрофореза гели фиксировали в смеси трихлоруксусная кислота : изопропиловый спирт : вода (12:25:63) в течение ночи, а затем окрашивали с помощью красителя Кумасси бриллиантовый голубой G-250 (0,04 %-ный коллоидный раствор, приготовленный на 3,5 %-ном водном растворе HClO₄) в течение 1,5 ч при комнатной температуре. После этого гель вымачивали в 5 %-ном растворе уксусной кислоты. При такой обработке интенсивность окраски белковых полос увеличивается, фон становится прозрачным и не требует дальнейшей отмывки [9]. Денситометрирование гелей проводили на лазерном денситометре LKB Ultrascan XL, снабженном интегратором. Расчет молекулярной массы полипептидных цепей белков проводили по методу Weber и Osborn [17] с использованием стандартов молекулярной массы (PTM4, фирмы «Serwa»). Статистическую обработку проводили по общепринятым методам вариационной статистики [11].

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали (таблица), что ваготомия печени приводит к изменению активности микросомальных монооксигеназ. Так, у взрослых животных после ваготомии аминопириндеметилазная активность снижается на 26,7 %, а у старых — достоверно возрастает на 17,3 %. Снижение анилингидроксилазной активности составляет 58,9 % у взрослых крыс и 60 % у старых. На фоне изменения активности микросомальных монооксигеназ концентрация цитохрома Р-450 у взрослых и старых животных существенно не изменяется ($P > 0,05$).

Нарушения симпатической иннервации печени приводят к снижению концентрации цитохрома Р-450 на 17,4 % у взрослых и на 14,5 % у старых животных. При этом анилингидроксилазная активность у взрослых крыс снижается на 26,7 %, у старых — на 46,3 %, а аминопириндеметилазная — возрастает на 60,7 % у взрослых животных и на 32,6 % у старых.

Таким образом, нарушения регуляции печени симпатической и парасимпатической нервной системой приводят к изменениям базаль-

Влияние денервации и введения фенobarбитала на концентрацию цитохрома Р-450, аминопириндеметилазную (АПД) и анилингидроксилазную (АГ) активности микросом печени взрослых и старых крыс ($\bar{X} \pm m$)

Условие опыта	Цитохром Р-450, нмоль/мг	АПД, нмоль·мг ⁻¹ × × мин ⁻¹	АГ, нмоль·мг ⁻¹ × × мин ⁻¹
Взрослые крысы			
Контроль	0,616±0,081	5,52±1,19	0,326±0,027
Ваготомия	0,529±0,146	4,05±1,12*	0,134±0,056*
Симпатотомия	0,509±0,062*	8,87±1,21*	0,239±0,050*
Фенobarбитал	1,728±0,023*	14,06±1,92*	0,890±0,034*
Ваготомия и фенobarбитал	1,197±0,027*	9,58±1,33*	0,623±0,012**
Симпатотомия и фенobarбитал	1,535±0,096*	12,94±0,66*	0,734±0,050**
Старые крысы			
Контроль	0,607±0,062	4,72±0,62	0,395±0,070
Ваготомия	0,521±0,095	5,54±0,39*	0,158±0,049*
Симпатотомия	0,519±0,068*	6,26±1,75	0,212±0,033*
Фенobarбитал	1,238±0,130*	10,63±0,66*	0,714±0,022*
Ваготомия и фенobarбитал	1,129±0,036*	10,05±2,19*	0,522±0,021**
Симпатотомия и фенobarбитал	1,337±0,044*	10,35±0,54*	0,789±0,045*

Примечания: в таблице представлены результаты исследования 7—8 животных; * $P < 0,05$ по сравнению с группой контрольных животных, + $P < 0,05$ по сравнению с группой животных, которым вводили фенobarбитал.

ной активности ферментов микросомального окисления. Следует учитывать, что изменение нервной регуляции оказывает существенное влияние на течение метаболических процессов в печени, включая синтез ферментных белков и активность генетического аппарата клетки [4, 6]. В связи с этим в следующей серии опытов было изучено влияние денервации печени на индуктивный синтез цитохрома Р-450, вызванный введением фенobarбитала.

Как видно из таблицы, под влиянием ваготомии у взрослых животных ослабляется индуктивный эффект фенobarбитала, определяемый по концентрации цитохрома Р-450, аминопириндеметилазной и анилингидроксилазной активностям. Так, под влиянием фенobarбитала концентрация цитохрома Р-450 у ложнооперированных крыс увеличивается на 180 %, а у ваготомированных — на 94,3 %. При этом аминопириндеметилазная активность у контрольных крыс возрастает на 154,7 %, у денервированных — на 73,5 %, а анилингидроксилазная — на 173 и 91 % соответственно.

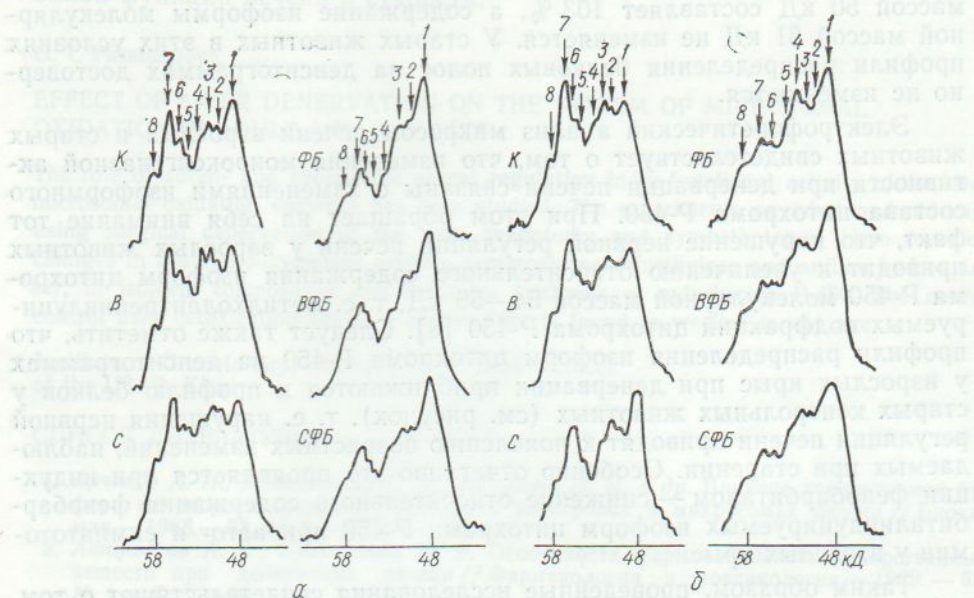
У старых крыс индуктивный эффект фенobarбитала, как для контрольных, так и для ваготомированных крыс, был значительно ниже, чем у взрослых. Концентрация цитохрома Р-450 у контрольных животных при введении фенobarбитала увеличивалась на 103,9 %, активность аминопириндеметилазы и анилингидроксилазы — на 125 и 80,7 % соответственно. После ваготомии прирост значений этих показателей составлял 116,7, 112,9 и 32,1 % соответственно, т. е. снижение индуктивного эффекта фенobarбитала у ваготомированных старых крыс отмечалось лишь для анилингидроксилазной активности.

Под влиянием симпатотомии у взрослых животных также снижался индуктивный эффект фенobarбитала: прирост концентрации цитохрома Р-450 составлял 149 %, аминопириндеметилазы — 134 %, анилингидроксилазы — 125 %, что на 31, 20 и 48 % соответственно ниже, чем в группе контрольных животных. У старых крыс, в отличие от взрослых, нарушение симпатической иннервации печени не изменяло индуктивный синтез микросомальных монооксигеназ по всем изучаемым показателям.

Таким образом, симпатическая и парасимпатическая денервация печени вызывает существенные изменения функциональной активности

ферментов микросомального окисления. Большая выраженность постденервационных изменений монооксигеназной активности и индуктивного синтеза цитохрома Р-450 у взрослых животных, по сравнению со старыми, свидетельствует об ослаблении нервного контроля в старости над детоксикационной функцией печени.

Результаты исследований показывают, что постденервационные изменения монооксигеназной системы гепатоцитов у взрослых и старых животных весьма неоднородны и носят порой разнонаправленный



Денситограммы электрофоретического разделения белков микросом печени взрослых (а) и старых (б) крыс. Группы животных — К — контроль, В — ваготомия, С — симпатотомия, ФБ — фенobarбитал, ВФБ — ваготомия и фенobarбитал, СФБ — симпатотомия и фенobarбитал. Стрелками обозначены изоформы цитохрома Р-450 молекулярной массой (кД):

1 — 48, 2 — 50, 3 — 51, 4 — 52, 5 — 54, 6 — 55, 7 — 56, 8 — 58.

характер. Так, на фоне незначительных изменений концентрации цитохрома Р-450 после ваготомии у взрослых и старых животных существенно снижается анилингидроксилазная активность. Аминопириндеметилазная — у взрослых крыс снижается, у старых — возрастает. Симпатотомия приводит к выраженному снижению концентрации цитохрома Р-450 у взрослых и старых крыс и разнонаправленным сдвигам аминопириндеметилазной и анилингидроксилазной активностей.

Для анализа этих изменений проведено электрофоретическое разделение белков микросом печени взрослых и старых крыс. На рисунке представлены денситограммы белков молекулярной массой от 46 до 60 кД, т. е. той области, в которой находятся изоформы цитохрома Р-450. Результаты исследования денситограмм показали, что общая площадь этой области в различных сериях опытов практически одинакова ($P > 0,02$), однако относительная площадь отдельных пиков существенно изменяется. Так, под влиянием ваготомии у взрослых крыс на 98 % увеличивается содержание изоформы цитохрома Р-450 молекулярной массой 54 кД, на 60 % возрастает изоформа молекулярной массой 50 кД. У старых крыс увеличение изоформы цитохрома Р-450 молекулярной массой 54 кД при ваготомии составляет только 29 %. Симпатотомия приводит к увеличению площади полос для белков молекулярной массой 50, 54 и 56 кД у взрослых животных на 65, 72 и 24 % соответственно, а у старых — полипептидов молекулярной массой 51 и 52 кД (на 32 %). При этом у старых крыс существенно уменьшаются изоформы цитохрома Р-450 молекулярной массой 54 и 56 кД — на 60 и 36 %. Под влиянием фенobarбитала у взрослых животных

увеличивается относительное содержание белков молекулярной массой 50 и 51 кД (на 128 и 62 % соответственно) и снижается — в области 54—58 кД (на 40—60 %). У старых крыс эти изменения выражены меньше — прирост площади полипептидов молекулярной массой 50 кД составляет 63 %. Введение фенobarбитала на фоне ваготомии у взрослых крыс приводит к менее выраженному приросту содержания изоформ молекулярной массой 50 и 51 кД — на 65 и 40 % соответственно, а на фоне симпатотомии прирост содержания изоформы молекулярной массой 50 кД составляет 103 %, а содержание изоформы молекулярной массой 51 кД не изменяется. У старых животных в этих условиях профили распределения белковых полос на денситограммах достоверно не изменяются.

Электрофоретический анализ микросом печени взрослых и старых животных свидетельствует о том, что изменения монооксигеназной активности при денервации печени связаны с изменениями изоформного состава цитохрома Р-450. При этом обращает на себя внимание тот факт, что нарушение нервной регуляции печени у взрослых животных приводит к увеличению относительного содержания изоформ цитохрома Р-450 молекулярной массой 54—56 кД, т. е. метилхолинтрениндуцируемых подфракций цитохрома Р-450 [8]. Следует также отметить, что профили распределения изоформ цитохрома Р-450 на денситограммах у взрослых крыс при денервации приближаются к профилю белков у старых контрольных животных (см. рисунок), т. е. нарушения нервной регуляции печени приводят к появлению возрастных изменений, наблюдаемых при старении. Особенно отчетливо это проявляется при индукции фенobarбиталом — снижение относительного содержания фенobarбиталиндуцируемых изоформ цитохрома Р-450 при ваго- и симпатотомии у взрослых крыс.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что функциональное состояние микросомальной монооксигеназной системы во многом определяется адрен- и холинергическими нервными влияниями, роль которых в старости существенно ослабляется. Ослабление нервных влияний на систему микросомального окисления при старении может быть связано со сдвигами в структуре нервных окончаний, снижением синтеза медиаторов и с изменениями состояния эффектора. Примечательно, что постденервационные изменения изоформного состава и каталитической активности цитохрома Р-450 у взрослых животных во многом напоминают изменения системы микросомального окисления печени в старости. В основе регуляции ферментативной активности катехоламинами и ацетилхолином лежит их влияние на обмен циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) и Ca^{2+} [10]. В частности, каталитическая активность отдельных изоформ цитохрома Р-450 регулируется цАМФ- и Ca^{2+} -фосфолипидзависимыми протеинкиназами — при фосфорилировании цитохром Р-450 переходит в неактивную форму — цитохром Р-420 [16]. С одной стороны, введение крысам изадрина (активация аденилатциклазы) или теофиллина (ингибирование фосфодиэстеразы) приводит к увеличению содержания цитохрома Р-450, возрастанию скорости окисления НАДФН и гидроксирования анилина в микросомах печени, а введение инсулина, снижающего содержание цАМФ за счет активации фосфодиэстеразы, вызывает противоположный эффект [3]. С другой стороны, цАМФ- и Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование является одним из основных механизмов регуляции активности биосинтетических процессов, в том числе и синтеза структурных и ферментных белков эндоплазматического ретикула гепатоцитов. В действии катехоламинов и ацетилхолина на каталитическую активность цитохрома Р-450, по-видимому, имеют значение оба механизма — «срочное» регулирование базального уровня цитохрома Р-450 его фосфорилированием — дефосфорилированием при изменении физиологического состояния клетки и опосредованное — активацией генетического аппарата клетки, приводящей к синтезу de novo определен-

ных изоформ цитохрома Р-450 при поступлении ксенобиотиков. Это предположение подтверждается результатами проведенных исследований, свидетельствующими о том, что нарушения нервной регуляции печени приводят к изменениям каталитической активности цитохрома Р-450, его изоформного состава и индуктивного синтеза. При старении нервный контроль над системой микросомального окисления ослабляется, что, возможно, является одной из причин снижения детоксикационной функции печени в старости.

G. I. Paramonova

EFFECT OF LIVER DENERVATION ON THE SYSTEM OF MICROSOMAL OXIDATION IN ADULT AND OLD RATS

The role of adren- and cholinergic neural regulation in the functional activity of the liver microsomal oxidation enzymes has been studied. The experiments on adult and old rats using surgical denervation of the liver (vagotomy and sympathectomy) have revealed changes in the monooxygenase activity (aminopyrine demethylase and aniline hydroxylase), in isoform composition and inductive synthesis of cytochrome P-450. The neural control over detoxication function of the liver is found to weaken in old age.

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А. И., Девиченский В. М., Карузина И. И. и др. Влияние концентрации буфера на скорость реакций транспорта электронов в микросомах печени // Биохимия.— 1968.— 33, № 3.— С. 479—485.
2. Аширметов А. Х., Краковский М. Э. Особенности фармакокинетики лекарственных веществ при денервации печени // Фармакология и токсикология.— 1989.— 52, № 1.— С. 77—80.
3. Бушма М. И., Лукиенко П. И., Легонькова Л. Ф. Влияние веществ, изменяющих внутриклеточное содержание цАМФ, на активность цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ печени крыс // Цитохром Р-450 и охрана внутренней среды человека // Тез. докл. Всесоюз. конф. (Москва, 12—18 августа 1985 г.).— Пушкино, 1985.— С. 58—59.
4. Голиков С. Н., Долго—Сабуров В. Б., Елаев Н. Р., Кулешов В. И. Холинергическая регуляция биохимических систем клетки.— М.: Медицина.— 1985.— 224 с.
5. Дубовая Т. К., Мальцева И. К., Жирнов Г. Ф., Лисицина В. Б. Морфофункциональный анализ реакций эндоплазматической сети гепатоцитов ваготомированной печени на введение фенобарбитала / Цитохром Р-450 и охрана окружающей среды // Тез. докл. Всесоюз. конф. (Новосибирск, 27—31 июля 1987 г.) — Новосибирск, 1987.— С. 97.
6. Ильин В. С., Протасова Т. Н., Титова Г. В., Шаныгина Г. И. Биохимические основы механизмов гомеостаза // Гомеостаз.— М.: Медицина.— 1981.— С. 114—160.
7. Карузина И. И., Арчаков А. И. Выделение микросомной фракции и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии.— М.: Медицина, 1977.— С. 49—62.
8. Мишин В. М., Ляхович В. В. Множественные формы цитохрома Р-450.— Новосибирск: Наука.— 1985.— 181 с.
9. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование.— М.: Наука, 1981.— 288 с.
10. Сергеев П. В., Мимановский Н. Л. Рецепторы.— М.: Медицина, 1987.— 397 с.
11. Урбах В. Б. Биометрические методы.— М.: Наука, 1964.— 250 с.
12. Фроликис В. В. Старение. Нейрогуморальные механизмы.— Киев: Наук. думка, 1981.— 320 с.
13. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227, N 59.— P. 681—685.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.— 193.— P. 265—275.
15. Omura T., Sato S. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilisation, purification and properties // J. Biol. Chem.— 1964.— 239.— P. 2379—2385.
16. Pyerin W., Taniguchi H., Horn F. et al. Isozyme-specific phosphorylation of cytochromes P-450 and other drug metabolizing enzymes // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1987.— 142, N 3.— P. 885—892.
17. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // J. Biol. Chem.— 1969.— 244 N 16.— P. 4406—4412.

Ин-т геронтологии АМН СССР, Киев

Материал поступил
в редакцию 17.05.90