

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 577.15.04:577.151.04

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ЦИРРОЗ ПЕЧЕНИ КРЫС И РЕГУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФАКТОРОВ В АКТИВНОСТИ АТФ-ФОСФОГИДРОЛАЗ

А.С. МАРГАРЯН

Институт биохимии им. Буянтяна НАН РА, 375014, Ереван

Исследованы сдвиги активности Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз в изолированных митохондриях ткани. Было показано, что при циррозе каталитическая активность исследованных АТФаз в митохондриях печени заметно угнетается. Вводимый крысам на фоне цирроза α -токоферол восстанавливает активность фермента до уровня контрольных величин. Тиосульфат натрия в меньшей степени, но также способствует восстановлению активности фермента. Интерпретируется роль α -токоферола и его синергиста - тиосульфата натрия как главных факторов в системе эндогенной антирадикальной защиты клетки при экспериментальном циррозе печени.

Դետազոտվել է Mg^{2+} -, Ca^{2+} - և HCO_3^- -կախյալ ԱՏՖազների ակտիվության տեղաշարժերը այդ հյուսվածքից անջատված միտոքոնդրիումներում: Ցույց է տրվել, որ ցիռոզի դեպքում ԱՏՖազների կատալիտիկ ակտիվությունը լյարդի միտոքոնդրիումներում զգալիորեն ճնշվում է: Ցիռոզի ֆոնի վրա առնետներին ներարկված α -տոկոֆերոլը վերականգնում է ֆերմենտի ակտիվությունը մինչև ստույգի մեծությունների մակարդակ: Ներարկված նատրիումի թիոսուլֆատը համեմատաբար քիչ, բայց նույնպես վերականգնում է ֆերմենտի ակտիվությունը: Ակնհայտ է α -տոկոֆերոլի և նրա համազործիչ՝ նատրիումի թիոսուլֆատի դերը բջջի էնդոգեն հակառադիկալային պաշտպանության համակարգում՝ լյարդի փորձարարական ցիռոզի դեպքում:

At rats with experimental liver cirrhosis, induced by CCl_4 , the shifts of Mg^{2+} -, Ca^{2+} - and HCO_3^- -dependent ATPases activity in isolated mitochondria of that tissue are investigated. It was shown, that at a cirrhosis, in comparison with intact animals, the catalytic activity of the investigated ATPases in liver mitochondria is inhibited. Alpha-tocopherol introduced to rats on the background of a cirrhosis reduces the enzyme activity up to control level. Sodium thiosulfate also promotes the reduction of the enzyme activity, though to a lesser degree. It is clarified the role α -tocopherol and it synergist, sodium thiosulfate, as the main factors in the system of endogenous antiradical cell protection at experimental liver cirrhosis.

Митохондрии печени — цирроз — АТФазная активность — α -токоферол — тиосульфат натрия.

Цирроз печени - прогрессирующее заболевание, характеризующееся дистрофией или некрозом гепатоцитов, сопровождающееся глубокой

перестройкой дольковой и сосудистой архитектоники органа. Это заболевание в настоящее время является одним из распространенных в различных странах мира. Молекулярные механизмы патогенеза цирроза печени продолжают оставаться в поле зрения исследователей различных направлений гепатологии академического и прикладного профиля. Отсутствие принципиально новой информации, позволяющей осмысление истинных причинно-следственных факторов, обуславливающих природу указанной патологии, создает существенные трудности в поиске мер по нивелированию и коррекции причин, лежащих в основе инициации, развития и генерализации этиопатогенетических механизмов цирроза.

С отмеченной точки зрения особого внимания заслуживают расстройства, происходящие в различных структурах печени, как целостных клеток, так и их субклеточных образований, а также протекающие в них процессы метаболизма и функциональной активности.

Механизмы повреждающего действия CCl_4 in vivo при инициировании цирроза печени крыс связаны со снижением уровня антирадикальной защитной системы и повышением липидной перекисидации в печеночной ткани [8] с повышением содержания $\text{NO}\cdot$ [7, 9] и цитохрома с оксидазы [14] с расширением терминальных сосудов печени [13], со снижением тотального и венозного кровотока [12], с изменением кровяного давления в печени [13]. В этих условиях эксперимента наблюдается дисбаланс между продуцирующими и утилизирующими активными формами кислорода, в первую очередь супероксидных радикалов ($\text{O}_2\cdot^-$). Однако молекулярные механизмы непосредственного воздействия CCl_4 на отдельные компоненты энергетического метаболизма еще остаются открытыми [5].

В настоящей работе мы задались целью исследовать сдвиги в активности Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз в митохондриях печени крыс при циррозе печени, индуцированном CCl_4 , и нивелирующую роль факторов антиоксидантного действия — α -токоферола (ТФ) и тиосульфата натрия (ТСН) в этих отклонениях.

Материал и методика. Белые половозрелые крысы-самцы (массой 180–200 г) были разделены на шесть групп (по 6 животных в каждой). В течение 20-ти дней два раза в неделю опытным крысам внутрибрюшинно вводили 0,3 мл CCl_4 , в остальных группах животные получали CCl_4 и одновременно 0,4 мг ТФ или 1 мл ТСН. Контрольной группе вводили 1 мл физиологического раствора.

Животные были декапитированы под легким эфирным наркозом. Печень извлекали на холоду, промывали в охлажденном растворе 0,25 М сахарозы–0,02 М трис HCl буфера (рН 7,4). Ядерную фракцию печени выделяли центрифугированием при 800 g в течение 10 мин, митохондриальную — при 9000 g в течение 15 мин. Инкубационная смесь (2 мл) для определения АТФ-фосфогидролазной активности содержала: 1,6 мл 0,25 М сахарозы

0,02 М трис НСl буфера, 0,2 мл митохондрий (соответствующей 2,3 мг белка), 2 мМ АТФ (производство "Sigma corp"), растворенного в 0,2 М сахарозе, и 1 мМ Mg^{2+} ($MgCl_2$), Ca^{2+} ($CaCl_2$) или 40 мМ HCO_3^- ($NaHCO_3$) в конечной концентрации [5, 6]. Время инкубации смеси 30 мин. температура 37°. Об активности АТФазы судили по повышению в среде содержания неорганического фосфата, который определяли по Лоури и соавт. [10] в модификации Скулачева [6] и пересчитывали на 1 мг белка [11]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [11].

Результаты и обсуждение. Результаты наших экспериментов, приведенные в табл. 1, показывают, что при CCl_4 -индуцированном циррозе, по сравнению с интактными животными, общая (без добавления активаторов) АТФ-азная активность в изолированных митохондриях печени заметно (60 %) подавляется. Введение больным животным ТФ заметно (80 %) повышает каталитическую активность фермента по сравнению с контролем. Наблюдается также стимулирование активности фермента при совместном действии CCl_4 +ТСН по сравнению с одним ТСН. Согласно табл. 1, в присутствии ионов Mg активность фермента более чем в 2 раза стимулируется по сравнению с контролем. При циррозе у крыс активность Mg^{2+} -зависимой АТФазы подавляется в 2 раза. Однако в варианте с совместной инъекцией CCl_4 +ТФ полученные цифры приближаются к контролю.

Таблица 1. Mg^{2+} -зависимая АТФазная активность в митохондриях печени белых крыс при CCl_4 -индуцированном циррозе печени и корректирующее действие ТФ и ТСН (ΔP в мкатамах/мг белка/30 мин) $M \pm S M. E.$; $n=6$

Условия опытов	Общая активность (без добавления активаторов)	Mg^{2+} -АТФаза
Контроль	$5,68 \pm 0,07$	$12,42 \pm 0,11$
CCl_4	$3,45 \pm 0,03$ $P < 0,001$	$5,49 \pm 0,05$ $P < 0,001$
ТФ	$4,21 \pm 0,03$ $P < 0,001$	$5,68 \pm 0,24$ $P < 0,001$
CCl_4 +ТФ	$8,01 \pm 0,14$ $P_1^{**} < 0,001$	$9,98 \pm 0,04$ $P_1 < 0,001$
ТСН	$2,85 \pm 0,06$ $P < 0,001$	$4,50 \pm 0,10$ $P < 0,001$
CCl_4 +ТСН	$3,35 \pm 0,03$ $P_1 < 0,010$	$5,98 \pm 0,06$ $P_1 < 0,001$

*P – в сравнении с контролем.

**P₁ – в сравнении с получившей CCl_4 группой.

Сдвиги активности Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз при циррозе печени приведены в табл. 2.

CCl_4 заметно подавляет каталитическую активность Ca^{2+} , а также HCO_3^- -зависимых АТФаз. На фоне цирроза введенный ТФ интенсивно

восстанавливает активность фермента, которая, однако, не достигает уровня контрольных цифр.

Таблица 2. Сдвиги активности Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз в митохондриях печени белых крыс при CCl_4 -индуцированном циррозе печени и корректирующее действие антиоксидантных факторов

(ΔP в мкатах/мг белка/30 мин) $M \pm S M. E.$; $n=6$

Условия опытов	Ca^{2+} -АТФаза	HCO_3^- -АТФаза
Контроль	$12,90 \pm 0,12$	$9,25 \pm 0,30$
CCl_4	$6,76 \pm 0,02$ $P^* < 0,001$	$3,36 \pm 0,03$ $P < 0,001$
ТФ	$5,91 \pm 0,12$ $P < 0,001$	$3,05 \pm 0,09$ $P < 0,001$
$\text{CCl}_4 + \text{ТФ}$	$8,75 \pm 0,03$ $P_1^{**} < 0,001$	$6,04 \pm 0,22$ $P_1 < 0,001$
ТСН	$3,93 \pm 0,01$ $P < 0,001$	$2,25 \pm 0,01$ $P < 0,001$
$\text{CCl}_4 + \text{ТСН}$	$5,23 \pm 0,07$ $P_1 < 0,001$	$3,05 \pm 0,04$ $P_1 < 0,001$

*P — в сравнении с контролем.

**P₁ — в сравнении с получившей CCl_4 группой.

Результаты наших исследований свидетельствуют о важном мобилизирующем влиянии ТФ и его синергиста ТСН на соответствующие системы эндогенной антирадикальной защиты клетки (табл. 1, 2). С этой точки зрения особого внимания заслуживает ТСН, отрекомендовавший себя [2-4] в качестве эффективного синергиста гидроксиформы эндогенного ТФ — главного представителя антиоксидантного механизма различных биологических систем организма. Подобная трактовка наиболее приемлема в отношении ткани печени, отличающейся многопрофильностью функциональной активности и главным образом наличием обезвреживающих антитоксических механизмов, направленных на нейтрализацию ряда вредоносных факторов, участвующих в инициации, развитии и генерализации оксидативного стресса как главного патологического начала любого болезненного состояния организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М., 1967.
2. Карагезян К.Г., Симаворян П.С., Овакимян С.С., Бабок Ю.В. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 7, 45-49, 1975.
3. Матиян Г.В. Изв. АН АрмССР (сер. биол.), 12, 6, 33-42, 1959.

4. Матинян Г.В. Биолог. журн. Армении, 21, 9, 22-29, 1968.
5. Симомян А.А., Бадалян Р.Б., Симомян Л.А., Степанян Р.А., Галоян А.А. Нейрохимия, 19 (2), 143-145, 2002.
6. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 564, 1989.
7. Fields M., Lewis C.G. Ann. Clin. Biochem., 13, 656-663, 1997.
8. Gonzalez-Reimers E., Lopez-Lirola A., Olivera R.M. et al. Biol. Trace. Elem. Res., 93, 127-140, 2003.
9. Koruk M., Aksoy H., Aksoy F., Onuk M.D. Ann. Clin. Lab. Sci., 32, 252-256, 2002.
10. Lowry O.H., Lopez J.A. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
12. Richter S., Mocke I., Menger M.D., Vollmar B. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol., 279, 454-462, 2000.
13. Sherman I.A., Pappas S.C., Fisher M.M. Am. J. Physiol., 258, 460-465, 1990.
14. Tanaka A., Morimoto T., Wakashiro S. et al. 41 741-748, 1987.

Поступила 29.IV.2005