Т.Г. Северина

Влияние кофеин-бензоата натрия на активность лизосомных ферментов печени и устойчивость крыс к острой иммерсионной гипотермии

Белорусский государственный медицинский университет

Изучено влияние кофеин-бензоата натрия на температуру тела и активность лизосомных ферментов печени при острой иммерсионной гипотермии у крыс, неустойчивых к холоду. Установлено, что кофеин-бензоат натрия в дозе 2,5 мг/кг повышает устойчивость крыс к холоду, что проявляется снижением скорости развития и глубины гипотермии животных в процессе охлаждения, и оказывает выраженное стабилизирующее действие на мембраны лизосом печени крыс.

Ключевые слова: кофеин-бензоат натрия, активность лизосомных ферментов, иммерсионная гипотермия, устойчивость к холоду.

Изучение механизмов устойчивости организма к холоду имеет большое социальное и медицинское значение для человека. Такие исследования способствуют разработке подходов и методов повышения устойчивости к холоду, способов оказания помощи и спасения людей при различных аварийных ситуациях, когда создается опасность переохлаждения.

Общее переохлаждение как фактор, ограничивающий выживаемость, имеет исключительное значение на Военно-Морском флоте. По разным оценкам, потери от холода во время боевых операций на море составляют от 15 до 30% и стоят на втором месте после ранений [4]. Выполнение различных работ на море в связи с освоением мировых запасов сырья, глубоководные погружения и в особенности морские катастрофы еще больше расширяют ситуаций, при которых вероятно возникновение гипотермии, угрожающей жизни человека.

Одним из наиболее опасных видов гипотермии, характеризующейся быстрым снижением температуры тела, нарушением жизненно важных функций организма и угрозой жизни человека и животных, является иммерсионная гипотермия, т.е. охлаждение организма при полном или частичном погружении в воду. Высокая теплоемкость воды значительно ускоряет процесс отдачи тепла, и даже при не очень низкой температуре воды гипотермия развивается очень быстро. При данном виде гипотермии индивидуальная устойчивость организма к холоду, позволяющая организму противостоять быстрому охлаждению, определяет вероятность выживания, так как всего через несколько часов, а иногда и раньше, при иммерсионной гипотермии могут наступить смертельные остановка дыхания и кровообращения.

В основе устойчивости организма к действию холода лежат многочисленные механизмы, реализующиеся на уровне целостного организма и на клеточном уровне. К ним относятся нервные и гуморальные механизмы регуляции теплопродукции, механизмы внутриклеточной регуляции соотношения процессов окисления и фосфорилирования. В механизмах устойчивости к холоду на клеточном уровне большое значение имеют физико-химические свойства и проницаемость мембран, в том числе мембран лизосом. Степень проницаемости лизосомных мембран, определяющая уровень активности лизосомных ферментов в цитоплазме клетки, является одним из аспектов устойчивости организма к охлаждению.

Известно, что цАМФ и вещества, повышающие концентрацию цАМФ в клетке, играют важную роль в регуляции энергетического метаболизма и функций клетки в условиях различных экстремальных состояний, а также могут оказывать влияние на стабильность и проницаемость мембран лизосом [5,10,14]. Однако имеющиеся данные о направленности влияния противоречивы; в различных концентрациях такие вещества могут оказывать противоположные эффекты [10]. Влияние веществ, повышающих уровень цАМФ, как путем повышения синтеза, так и путем снижения распада цАМФ под действием фермента фосфодиэстеразы, на состояние мембран лизосом и на температуру тела животных при охлаждении не изучено.

На основании изложенного, целью данного исследования явилось изучение влияния ингибитора фосфодиэстеразы кофеин-бензоата натрия на температуру тела и активность лизосомных ферментов печени при охлаждении крыс, неустойчивых к холоду.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- предварительно отобрать группу крыс, неустойчивых к холоду;
- изучить динамику изменения ректальной температуры неустойчивых к холоду крыс в процессе охлаждения после введения им кофеина в сравнении с такими же животными, не получавшими кофеин;
- изучить и сравнить активность лизосомных ферментов в печени крыс контрольной и опытных групп.

Необходимость предварительного отбора неустойчивых к холоду крыс была продиктована существованием значительных различий устойчивости к холоду у животных одного и того же вида. В наших исследованиях было показано, что индивидуальная устойчивость к холоду у крыс одинаковой массы тела, одного пола и возраста может значительно отличаться, что проявляется в различной степени и скорости развития гипотермии в одних и тех же условиях охлаждения [11].

Опыты проводились на предварительно отобранных крысах с относительно низкой устойчивостью к холоду. Для отбора беспородные белые крысы-самцы массой 180-210 г подвергались охлаждению в течение 1 ч 20 мин в специально оборудованной холодильной камере в стандартных условиях (t воздуха 5°С, частичное погружение в воду, t воды 5°С, уровень воды 4,5 см). Для эксперимента отбирались крысы, ректальная температура которых за указанный период снижалась более, чем на 5°С по сравнению с исходной (37,4±0,1°С). Средняя температура отобранных крыс после охлаждения составила 29,5±0,2°С. После отбора крысы содержались в термонейтральных условиях в течение 20 дней.

Затем отобранные крысы (n=32) были разделены случайным образом на 3 группы – контрольную и две опытных, и подвергнуты охлаждению в тех же стандартных условиях. Непосредственно перед охлаждением животным опытной группы I (n=10) вводили кофеин-бензоат натрия внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг, животным группы II (n=11) – в дозе 2,5 мг/кг. Контрольным крысам (n=11) вводили физиологический раствор. Температуру измеряли через 1 ч 20 мин и через 2 ч 40 мин после начала охлаждения, после чего производили взятие крови и ткани печени крыс.

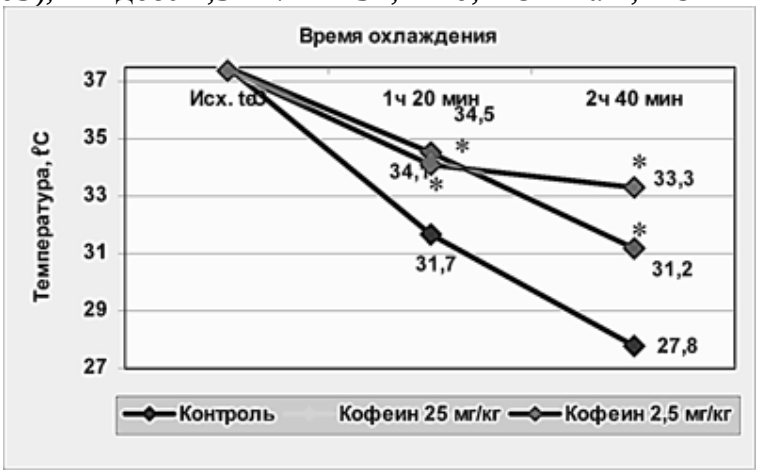
В печени и сыворотке крови крыс изучали активность лизосомных ферментов кислой фосфатазы, b-галактозидазы, кислых катепсинов D, B1, ДНК-азы и гиалуронидазы. В гомогенате печени определяли свободную и общую активности. Свободную активность определяли в гомогенатах печени, содержащих неразрушенные лизосомы, общую активность определяли после добавления в

гомогенат печени детергента тритон Х-100 и полного освобождения лизосомных ферментов. Показателем проницаемости мембран лизосом служила относительная свободная активность лизосомных ферментов, то есть доля свободной активности в общей, выраженная в процентах [10].

Результаты обработаны методами параметрической статистики и представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического (± sx). Достоверность различий между показателями трех экспериментальных групп оценивали по критерию t Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений [1]. Результаты считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние кофеин-бензоата натрия на температуру тела неустойчивых к холоду крыс в процессе охлаждения. Установлено, что внутрибрюшинное введение кофеин-бензоата натрия значительно замедляет снижение ректальной температуры неустойчивых к холоду крыс в процессе охлаждения (рис. 1). Так, уже после охлаждения в течение 1 часа 20 минут ректальная температура неустойчивых к холоду крыс, получавших кофеин-бензоат натрия, оказалась достоверно выше температуры тела таких же крыс контрольной группы, которым вводили физиологический раствор. За указанный период температура тела контрольных крыс снизилась до 31,7± 0,6°С, что соответствует критериям отбора в группу неустойчивых к холоду животных. Таким образом, крысы контрольной группы по-прежнему имели низкую устойчивость к холоду. В то же время температура тела неустойчивых к холоду крыс, получавших кофеин-бензоат натрия в дозе 25 мг/кг, была равна 34,5 ± 0,4°С, т.е. на 2,8°С выше ($p < 0,005$), и в дозе 2,5 мг/кг – 34,1 ± 0,4°С – на 2,4°С выше ($p < 0,005$).



* - достоверное отличие от контроля

Рис. 1 Ректальная температура неустойчивых к холоду крыс в процессе охлаждения в условиях действия кофеин-бензоата натрия

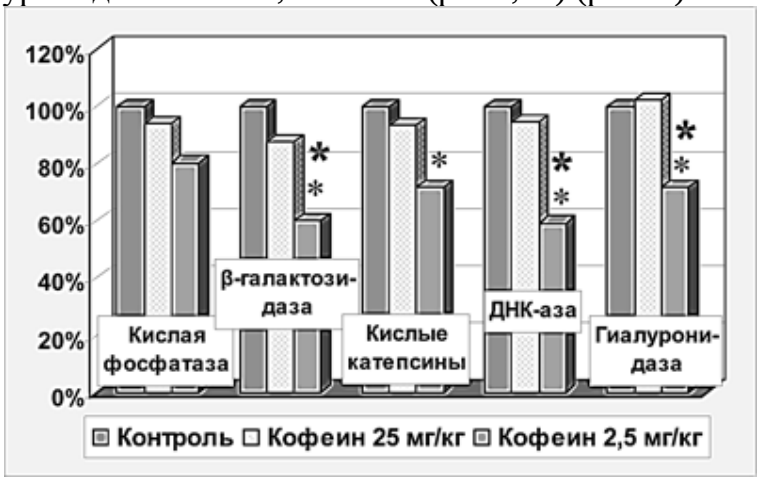
При дальнейшем охлаждении животных, до достижения общего времени охлаждения 2 ч 40 мин, температура тела крыс контрольной группы составила 27,8 ± 1,2°С, в то время как у крыс, получавших кофеин-бензоат натрия в дозе 25 мг/кг, ректальная температура составила 31,2 ± 0,9°С, что на 3,4°С выше ($p < 0,05$). Животные, которым вводили кофеин-бензоат натрия в дозе 2,5 мг/кг, по сравнению с контрольными крысами поддерживали температуру тела на 5,5°С выше – 33,3 ± 0,4°С ($p < 0,005$).

Таким образом, введение кофеин-бензоата натрия повышает способность животных поддерживать более высокую температуру тела в условиях охлаждения, причем в дозе 2,5 мг/кг кофеин-бензоат натрия оказывает более выраженное действие.

Влияние кофеин-бензоата натрия на активность лизосомных ферментов печени неустойчивых к холоду крыс при охлаждении. Установлено, что кофеин-бензоат натрия в дозе 2,5 мг/кг оказывает выраженное влияние на активность лизосомных ферментов в печени и сыворотке крови крыс при острой иммерсионной гипотермии.

При исследовании общей активности лизосомных ферментов печени у неустойчивых к холоду крыс, получивших кофеин, выявлено снижение по сравнению с контрольными неустойчивыми к холоду животными общей активности кислых катепсинов. Общая активность остальных изучавшихся ферментов не отличается от контроля.

Исследование свободной активности ферментов лизосом показало, что введение кофеин-бензоата натрия в дозе 25 мг/кг не влияет на свободную активность всех изучавшихся ферментов, которая не отличалась от активности ферментов в печени контрольных крыс. В то же время введение кофеин-бензоата натрия в дозе 2,5 мг/кг приводит к значительному снижению свободной активности большинства изучавшихся ферментов. Так, по сравнению с контролем свободная активность b-галактозидазы оказалась ниже на 39,9% ($p<0,005$), кислых катепсинов – на 28,3% ($p<0,02$), ДНК-азы – на 40,9% ($p<0,005$), гиалуронидазы – на 28,2% ($p<0,02$). Свободная активность ферментов в этой группе достоверно ниже и по сравнению с группой крыс, получавших кофеин-бензоат натрия в дозе 25 мг/кг: свободная активность b-галактозидазы на 31,3% ниже ($p < 0,01$), ДНК-азы – на 37,4% ($p < 0,02$), гиалуронидазы – на 29,7% ниже ($p < 0,01$) (рис. 2).



* - достоверное отличие от контроля;

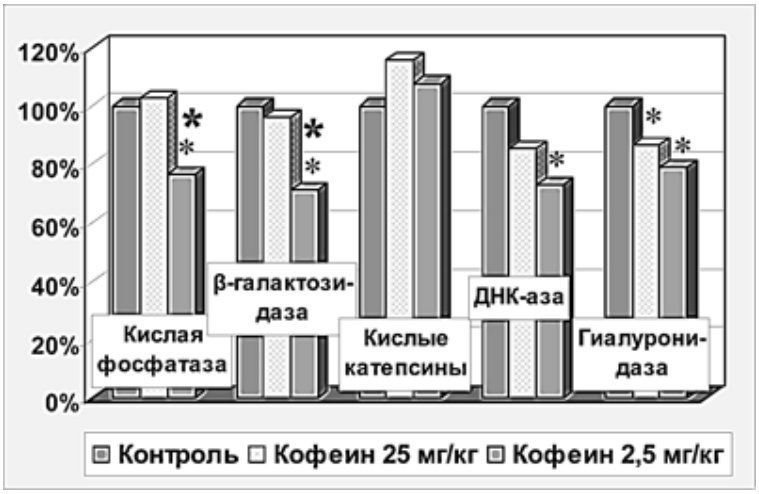
* - достоверное различие между опытными группами I и II

Рис. 2. Влияние кофеин-бензоата натрия на свободную активность лизосомных ферментов печени неустойчивых к холоду крыс при охлаждении (в процентах к тем же показателям контрольных неустойчивых к холоду крыс)

Установлено, что кофеин-бензоат натрия в дозе 2,5 мг/кг снижает и относительную свободную активность изучавшихся ферментов (рис. 3). Так, у крыс, получавших кофеин в этой дозе, относительная свободная активность кислой фосфатазы была ниже на 23,6% ($p<0,02$), b-галактозидазы – на 28,8% ($p<0,005$), ДНК-азы – на 26,7% ($p<0,005$), гиалуронидазы – на 21% ($p<0,005$) по сравнению с

контрольными животными. Относительная свободная активность ряда ферментов в данной группе достоверно ниже и по сравнению с группой животных, получавших кофеин-бензоат натрия в дозе 25 мг/кг: относительная свободная активность кислой фосфатазы ниже на 25,5% ($p<0,01$), β-галактозидазы – ниже на 25,7% ($p<0,005$).

Введение кофеина в дозе 25 мг/кг приводит к снижению по сравнению с контролем относительной свободной активности гиалуронидазы (на 13,5%, $p<0,01$). Относительная свободная активность остальных изучавшихся ферментов в этой группе не отличается от контроля.



* - достоверное отличие от контроля;

* - достоверное различие между опытными группами I и II

Рис. 3. Влияние кофеин-бензоата натрия на относительную свободную активность лизосомных ферментов печени неустойчивых к холоду крыс при охлаждении (в процентах к тем же показателям контрольных неустойчивых к холоду крыс)

Итак, основное влияние кофеина на активность лизосомных ферментов печени неустойчивых к холоду крыс заключаются в снижении свободной и относительной свободной активности большинства изучавшихся лизосомных ферментов. Эти показатели отражают проницаемость лизосомных мембран. Следовательно, более низкие свободная и относительная свободная активности лизосомных ферментов печени крыс, получавших кофеин в дозе 2,5 мг/кг, свидетельствуют о повышении стабильности лизосомных мембран печени. Бóльшая стабильность мембран лизосом у этой группы животных сочетается с большей устойчивостью к охлаждению.

Полученные эффекты кофеин-бензоата натрия могут реализоваться посредством различных механизмов. С одной стороны, кофеин является ингибитором фосфодиэстеразы и вызывает повышение внутриклеточной концентрации цАМФ [2,8], что оказывает многостороннее влияние на внутриклеточные процессы, подобное влиянию катехоламинов. Активация протеинкиназы А и фосфорилирование ряда внутриклеточных субстратных белков, в том числе ферментов, приводит к усилению многих процессов, способствующих повышению выработки энергии. Под влиянием цАМФ усиливаются процессы гликогенолиза, липолиза, стимулируются метаболические процессы, в том числе в клетках тканей и органов, которые вносят вклад в теплопродукцию (печень, сердце, скелетные мышцы). Усиление гликогенолиза и липолиза приводит к возрастанию содержания в крови и тканях

глюкозы и неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), что позволяет повысить интенсивность окислительного фосфорилирования. Так, было показано, что кофеин-бензоат натрия повышает скорость потребления кислорода митохондриями миокарда [12]. В результате повышается продукция тканями энергии в виде АТФ и в виде тепла. Кроме того, известно, что НЭЖК обладают разобщающим действием на процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях. Соответственно, возрастание содержания НЭЖК ведет к повышению также и свободного (нефосфорилирующего) окисления, что позволяет повысить прямую продукцию тепла и поддерживать более высокую температуру тела при охлаждении. Прямая продукция тепла в результате свободного окисления имеет первостепенное значение для поддержания более высокой температуры тела в условиях охлаждения [6].

Другим, не менее важным механизмом действия кофеин-бензоата натрия является ингибирование аденозиновых рецепторов. Известно, что ингибирование аденозиновых рецепторов, по сравнению с ингибированием фосфодиэстеразы, осуществляется при более низких дозах кофеина [8]. В условиях охлаждения, когда развивается гипоксия тканей, образование аденозина может возрастать в значительной степени, вследствие снижения активности аденозинкиназы и торможения фосфорилирования аденозина, а также повышения распада АМФ под действием внутриклеточной 5’-нуклеозидазы. Повышение образование аденозина приводит к его выходу из клетки и возрастанию внеклеточной концентрации аденозина. При гипотермии внеклеточная концентрация аденозина может возрастать также вследствие снижения активности транспортеров, осуществляющих перенос аденозина в клетку [13]. Внеклеточный аденозин, связываясь с рецепторами различных типов, способен оказывать целый ряд эффектов, противоположных катехоламинам и симпато-адреналовой системе. Так, стимуляция аденозиновых А1 рецепторов приводит к снижению ЧСС, подавлению липолиза, снижению клубочковой фильтрации, седативному действию на ЦНС. Описаны антикалоригенный и гипотермический эффекты аденозина [9]. Механизм эффектов стимуляции А1 рецепторов связан с ингибированием активности аденилатциклазы. Кофеин (и кофеин-бензоат натрия) ингибирует А1 рецепторы [7], и таким путем оказывает противоположные эффекты. Данный механизм действия кофеин-бензоата натрия также реализуется через повышение концентрации цАМФ и его последующие эффекты.

Еще одним компонентом действия кофеина, важным для теплопродукции, является стимуляция высвобождения норадреналина из пресинаптических окончаний [7].

Все перечисленные механизмы действия кофеина направлены на повышение теплопродукции и поддержание температуры тела в условиях острого охлаждения. Очевидно, благодаря всем указанным эффектам кофеин-бензоата натрия исходно неустойчивые к холоду крысы смогли поддерживать температуру тела, значительно превышающую ректальную температуру таких же крыс, которым препарат не вводили.

Те же механизмы действия кофеин-бензоата натрия должны лежать и в основе эффекта поддержания стабильности лизосомных мембран. Показано, что цАМФ может оказывать влияние на стабильность мембран лизосом печени крыс, нарушенную вследствие травматического шока [3]. Отмечена корреляция между

содержанием цАМФ и стабильностью лизосом печени крыс после остановки сердца [5].

Возможным механизмом влияния кофеина и цАМФ на состояние мембран лизосом может служить повышение окислительного фосфорилирования и повышение продукции АТФ. Поддержание энергозависимых процессов – работы насосов, ферментных систем клетки, необходимо в том числе и для поддержания стабильного состояния мембран лизосом. Кроме того, имеются данные о наличии в мембранах лизосом цАМФ-зависимой протеинкиназы [16]. Это позволяет предполагать, что цАМФ может оказывать непосредственное действие на состояние структурных белков в составе мембран лизосом, от которых, в свою очередь, зависит проницаемость мембран.

Отчасти большая стабильность мембран лизосом в условиях действия кофеин-бензоата натрия может быть прямым следствием поддержания более высокой температуры тела из-за повышенной теплопродукции, т.е. в стабилизацию мембран лизосом могут вносить вклад все выше описанные механизмы действия кофеин-бензоата натрия.

Следует отметить, что и стабилизация мембран лизосом, и повышение устойчивости к охлаждению получены при введении кофеин-бензоата натрия в дозе 2,5 мг/кг. Однако более высокая доза кофеин-бензоата натрия, 25 мг/кг, в меньшей степени повышала способность крыс поддерживать температуру тела в условиях охлаждения и практически не оказывала стабилизирующего действия на мембраны лизосом печени крыс. Можно предположить, что отсутствие стабилизирующего действия на мембраны лизосом при введении большей дозы препарата связано с усилением липолиза и повреждением мембран лизосом, вызванных стимуляцией процессов перекисного окисления липидов. Известно, что при усилении липолиза интенсивность перекисного окисления липидов возрастает, что может препятствовать развитию стабилизирующего эффекта.

Таким образом, кофеин-бензоат натрия в дозе 2,5 мг/кг снижает скорость развития и глубину гипотермии животных в процессе охлаждения и оказывает выраженное стабилизирующее действие на мембраны лизосом печени крыс. Стабилизация мембран лизосом печени снижает повреждающее действие холода на клеточном уровне и является одним из компонентов вызываемого кофеином повышения устойчивости животных к холоду, которое проявляется замедлением развития гипотермии в процессе общего охлаждения организма.

Полученные результаты позволяют предположить, что кофеин-бензоат натрия и другие вещества, повышающие уровень цАМФ, могут быть использованы для повышения устойчивости животных к острой иммерсионной гипотермии.

Литература

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М., Практика, 1999. 459 с.

2. Горбачевская, Л. В. Изменения циклазной системы скелетных мышц и содержания циклических нуклеотидов в плазме крови крыс при приеме кофеина / Л. В. Горбачевская // Вестник мед. химии. 1983. Т. 29. Вып. 4. С. 47–51.

3. Государский, В. И. Влияние цАМФ, инкапсулированного в лизосомах, на стабильность мембран лизосом печени крыс / В. И. Государский // Структура и функция лизосом. Тезисы докладов 2-ого Всесоюзного симпозиума. Новосибирск, 1980. С. 55.

4. Зайцев, А. Г. Резистентность организма к холоду и ее фармакологическая коррекция: автореф. дис. … канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 1997. 23 с.

5. Иванова, Т. Н. Активность кислых гидролаз и содержание циклических нуклеотидов в сердце крыс при ишемии миокарда и в период постишемической реперфузии / Т. Н. Иванова, А. И. Иванов, Б. Ф. Коровкин, Н. И. Лосев // Бюл. эксп. биол. и мед. 1989. № 7. С. 30–32.

6. Исаакян, Л. А. Метаболическая структура температурных адаптаций. Изд. «Наука», Ленингр. отд. 1972. 135 с.

7. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману / под общей ред. А. Г. Гилмана. М., Практика, 2006. 520 с.

8. Кулинский, В. И. Биохимические механизмы биологического действия алкилксантинов / В. И. Кулинский // Успехи современной биологии, 1988. Т. 106. № 3. С. 347–362.

9. Ольховский, И. А. Влияние аденозина и других производных пурина на потребление кислорода, температуру тела и устойчивость животных к острой гипоксии и ионизирующему излучению / И. А. Ольховский, А. Н. Ковалевский, А. Д. Климова // Биологическое и медицинское значение моноаминов. Красноярск, 1985. С. 52–60.

10. Панин, Л. Е., Маянская, Н. Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. Новосибирск: Наука, 1987.

11. Северина, Т. Г. Динамика снижения ректальной температуры в процессе общего охлаждения крыс с различной устойчивостью к холоду / Т. Г. Северина // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 60-й науч. сессии сотрудников ун-та, посвящ. 60-летию Победы в Великой Отечественной войне. Витебск: ВГМУ, 2005. С. 451–452.

12. Ураков, А. Л. Изменение окислительного фосфорилирования при действии кофеин-бензоата натрия / А. Л. Ураков // Вопр. мед. химии. 1980. Т. 26. № 2. С. 198–200.

13. Dunwiddie, T.V., Diao, L. Regulation of extracellular adenosine in rat hippocampal slices is temperature dependent: role of adenosine transporters // Neuroscience. 2000. V. 95. P. 81–88.

14. Goldfarb, R.D., Glenn, T.M. Regulation of lysosomal membrane stabilization via cyclic nucleotides and prostaglandins – the effect of steroids and indomethacin // Molecular cellular aspects of shock and trauma / Eds. A.M. Lefer, W. Shumer. N.Y., 1983. V. III. P. 147–167.

15. Jacobson, K.A., Gao, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets // Nature Rev. Drug Disc., 2006. № 5. P. 247–264.

16. Wells, W.W., Collins, C.A. Phosphorylation of lysosomal membrane components as a possibly regulatory mechanism // Lysosomes in Biology and Pathology / Eds. J.T. Dingle, R.T. Dean, W. Sly. Amsterdam, 1984. V. 7. P. 119–141.