

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЕЧЕНИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС, УСТОЙЧИВЫХ К ХОЛОДУ

Белорусский государственный медицинский университет

Изучена активность лизосомных ферментов печени и сыворотки крови устойчивых к холоду крыс, находящихся в термонеutralных условиях. У крыс, устойчивых к холоду, по сравнению с контролем выявлены более низкие показатели активности отдельных ферментов печени, а также сыворотки крови, что может быть использовано в качестве одного из критериев устойчивости к холоду.

Одним из важных направлений научных исследований является изучение механизмов устойчивости организма к действию различных неблагоприятных факторов, в том числе к действию холода. Особенно важны такие исследования для людей, профессия которых связана с пребыванием в условиях холодного климата, например, для военнослужащих.

Изучение механизмов, лежащих в основе устойчивости организма к холоду, способствует не только поиску путей и способов ее повышения, но и выявлению критериев, на основании которых можно прогнозировать степень устойчивости организма к холоду.

Индивидуальная устойчивость организма к холоду изменяется в широких пределах и зависит от множества факторов, в частности, от активности важнейших регуляторных систем организма, особенностей метаболизма, влияния среды и т.д. [5,7].

В механизмах устойчивости к повреждающему действию холода на уровне клетки важную роль играет состояние биологических мембран, в том числе мембран лизосом, и степень проницаемости этих мембран для лизосомных ферментов [1,3,8]. Ранее нами было показано, что у животных с различной устойчивостью к холоду изменения активности лизосомных ферментов печени, вызванные охлаждением, значительно отличаются [4]. Можно предположить, что и без охлаждения и развития гипотермии у крыс, устойчивых к холоду, могут выявляться определенные отличия активности лизо-

сомных ферментов. В литературе имеются немногочисленные данные об предсуществующих в термонеutralных условиях отличиях некоторых биохимических показателей у животных с различной устойчивостью к холоду.

Так, И.А.Застенской было показано, что у устойчивых к холоду крыс по сравнению с неустойчивыми обнаруживаются различия в метаболизме липидов и содержании их в отдельных тканях [2].

Однако исследования активности лизосомных ферментов у устойчивых к холоду крыс, находящихся в термонеutralных условиях, не проводились. Изучение особенностей активности лизосомных ферментов печени у устойчивых к холоду крыс позволит выявить возможные критерии устойчивости организма к холоду.

Вместе с тем, с практической точки зрения, исследование тканевых ферментов сопряжено с рядом технических сложностей и неприемлемо для человека. В связи с этим, особое значение имеет выявление таких признаков устойчивости к холоду, для определения которых достаточно исследования показателей сыворотки крови.

Целью поставленных экспериментов являлось изучение активности лизосомных ферментов печени и сыворотки крови устойчивых к холоду крыс, находящихся в термонеutralных условиях, и сравнение их с интактными контрольными крысами.

Материал и методы

Опыты проведены на 25 беспородных белых крысах-самцах массой 180-200 г. Критерием для

отбора крыс в группу наиболее устойчивых к холоду (*устойчивые*) служила скорость снижения ректальной температуры при охлаждении. Для отбора животных подвергали охлаждению в течение 1 часа 20 минут в холодильной камере в специально подобранных стандартизированных условиях (температура воздуха 4°C, частичное погружение в воду с температурой 8°C, уровень воды 6 см). В конце охлаждения у крыс измеряли ректальную температуру электротермометром ТПЭМ-1 на глубине 4 см. За период охлаждения ректальная температура крыс снижалась до 35-29°C. В группу устойчивых к холоду отбирали крыс, имевших температуру не ниже 33°C. В среднем ректальная температура отобранных устойчивых к холоду крыс (n=13) составила 34,5±0,1°C. Для минимизации последствий холодового стресса после однократного охлаждения отобранные крысы содержались в термонейтральных условиях на стандартном рационе вивария в течение 20 дней. Через указанный период у крыс были взяты на исследование кровь и ткань печени.

В качестве группы сравнения использовались интактные контрольные крысы (n=12). На момент проведения забора материала температура крыс обеих групп не отличалась и составляла 37,1±0,1°C.

Печень перфузировали через портальную вену раствором сахарозы с ЭДТА, pH 7,4, затем навеску ткани печени массой 1 г гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком.

В гомогенатах печени и сыворотке крови крыс изучали активность лизосомных ферментов кислой фосфатазы, β-галактозидазы, кислых катепсинов D, B₁ и ДНК-азы [6].

В печени определяли свободную и общую активность ферментов.

Свободная активность ферментов определялась в гомогенатах печени, содержащих неразрушенные лизосомы, общая активность определялась после добавления в гомогенат печени детергента тритон X-100 и полного освобождения лизосомных ферментов. Показате-

лем проницаемости мембран лизосом служила относительная свободная активность лизосомных ферментов, то есть доля свободной активности в общей, выраженная в процентах.

Результаты обработаны стандартными статистическими методами. Достоверными считали различия при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования представлены в таблицах 1-3, а также на рисунке 1.

Группа I – крысы, устойчивые к холоду, группа II-интактные контрольные крысы. Значком * отмечены достоверные различия.

Опыты показали, что по активности большинства лизосомных ферментов между устойчивыми к холоду животными и интактными контрольными крысами не имеется существенных различий.

Так, свободная, общая и относительная свободная активность кислой фосфатазы, β-галактозидазы, ДНК-азы и гиалуронидазы в печени устойчивых к холоду и контрольных крыс достоверно не отличались (табл. 1-3).

Различия между двумя группами выявлены по показателям активности кислых катепсинов D и B₁.

Общая активность кислых катепсинов (табл. 1) оказалась на 15,4% ниже по сравнению с контролем (p < 0,01).

Свободная активность кислых катепсинов (табл. 2) также была ниже по сравнению с контролем на 24,3% (p < 0,02).

Так как и свободная, и общая активности этих

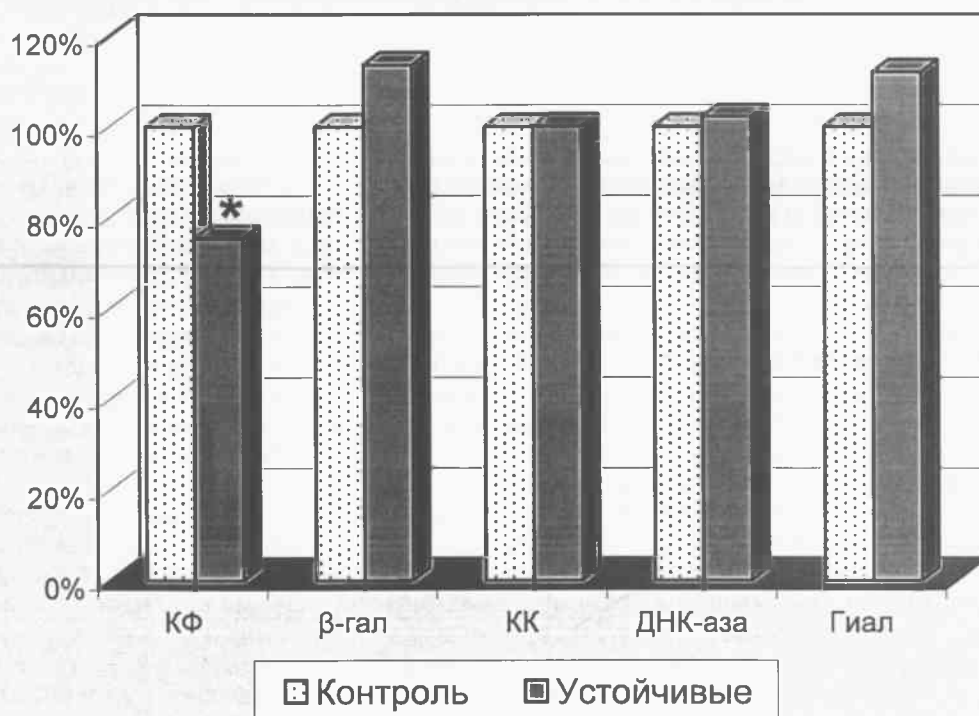


Рис.1. Активность лизосомных ферментов в сыворотке крови устойчивых к холоду крыс в % по отношению к контрольным крысам. КФ – кислая фосфатаза, β-гал - β-галактозидаза, КК – кислые катепсины D, B₁, гиал - гиалуронидаза

Общая активность лизосомных ферментов печени устойчивых к холоду и контрольных крыс

Группы	Кислая фосфатаза МкМ/г·час	β-галактозидаза мкМ/г·час	Катепсины нМ/г·час	ДНК-аза мкМ/г·час	Гиалуронидаза мкМ/г·24часа
I, n=13	528,68 ± 26,10	11,30 ± 0,55	90,60 ± 6,11*	18,48 ± 1,00	4,26 ± 0,20
II, n=12	531,99 ± 31,29	9,71 ± 0,66	107,14 ± 4,76	18,95 ± 0,89	4,16 ± 0,40

Таблица 2

Свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых к холоду и контрольных крыс

Группы	Кислая фосфатаза МкМ/г·час	β-галактозидаза мкМ/г·час	Катепсины нМ/г·час	ДНК-аза мкМ/г·час	Гиалуронидаза мкМ/г·24часа
I, n=13	220,41 ± 10,17	3,74 ± 0,23	31,39 ± 1,76*	7,30 ± 0,43	2,77 ± 0,15
II, n=12	250,08 ± 20,92	3,08 ± 0,26	41,47 ± 3,43	7,52 ± 0,46	2,74 ± 0,24

Таблица 3

Относительная свободная активность (в %) лизосомных ферментов печени устойчивых к холоду и контрольных крыс

Группы	Кислая фосфатаза %	β-галактозидаза %	Катепсины %	ДНК-аза %	Гиалуронидаза %
I, n=13	42,4 ± 2,2	33,1 ± 1,4	36,0 ± 2,4	40,0 ± 1,9	66,1 ± 4,2
II, n=12	46,6 ± 2,9	32,5 ± 2,8	39,0 ± 2,9	40,7 ± 3,3	64,5 ± 3,7

ферментов у устойчивых к холоду животных были ниже тех же показателей контрольных крыс, доля свободной активности в общей, выраженная в процентах, т.е. относительная свободная активность, в двух группах существенно не отличалась ($36,0 \pm 2,4\%$ у устойчивых к холоду крыс, $39,0 \pm 2,9\%$ у контрольных крыс, табл. 3).

Таким образом, при исследовании активности лизосомных ферментов печени единственным выявленным отличием устойчивых к холоду крыс от интактных контрольных животных является более низкая свободная и общая активность кислых катепсинов.

При исследовании сыворотки крови у устойчивых к холоду крыс выявлена более низкая активность кислой фосфатазы.

Активность этого фермента в сыворотке крови крыс, устойчивых к холоду, оказалась на $24,5\%$ ниже ($p < 0,05$) по сравнению с тем же показателем у контрольных крыс ($26,5 \pm 1,6 \times 10^{-1}$ мкМ/мл·час и $35,1 \pm 3,1 \times 10^{-1}$ мкМ/мл·час, соответственно, рис. 1).

Активность других изучаемых ферментов в сыворотке крови крыс обеих групп достоверно не отличалась.

Таким образом, у устойчивых к холоду крыс, находящихся в термонейтральных условиях, по сравнению с интактными животными имеются различия активности кислых катепсинов в печени и кислой фосфатазы в сыворотке крови.

Общая и свободная активность кислых катеп-

синов D и B₁ в печени, а также активность кислой фосфатазы в сыворотке крови у устойчивых к холоду крыс ниже по сравнению с интактными контрольными крысами.

Выявленная более низкая активность кислой фосфатазы в сыворотке крови устойчивых к холоду крыс по сравнению с контрольными интактными животными может быть использована в качестве одного из прогностических критериев индивидуальной устойчивости к холоду.

Литература

1. Горошинская И.А., Ананян А.А., Могильницкая Л.В., Шугалей В.С. Биохимические показатели дифференцировки холодового стресса и адаптации // Вопр. мед. химии.-1987.-№4.-С. 62-25.
2. Застенская И.А. Роль липидов в механизмах гипотермии и естественной терморезистентности // Нарушение механизмов регуляции и их коррекция: Тез. докл. IV Всесоюз. съезда патофизиологов, 3-6 окт. 1989, Кишинев. – М., 1989.-Т. 2.-С. 589.
3. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск: Наука, 1983.
4. Северина Т.Г. Активность лизосомных ферментов и стабильность мембран лизосом печени при охлаждении у крыс с различной устойчивостью к холоду. // Труды молодых ученых (Минского государственного медицинского института). – Мн.: МГМИ, 1998. – С. 208-214.
5. Тимочко М.Ф., Алексеева Я.И., Бобков Ю.Г. О некоторых биохимических механизмах жизнеобеспечения высокорезистентных животных // Пат. физиол. и эксп. тер. – 1991. – №2. – С. 28-29.
6. Юсипова Н.А. Гидролитические ферменты биологических жидкостей и скелетной мышцы белых крыс с адьювантным артритом // Вопр. мед. хим. – 1978. – № 3. – С. 362 – 368.
7. Van Breukelen, Frank, and Sandra L. Martin. Invited review: Molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses? // J. Appl. Physiol. – 2002. – Vol. 92 – P. 2640-2647.
8. Zhang G.J., Liu H.W., Yang L. et al. Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability // J. Membr. Biol. – 2000. – Vol. 175 (1) – P. 53-62.