

Активность лизосомных ферментов печени крыс, имеющих различную устойчивость к холоду

Белорусский государственный медицинский университет

Изучена активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс, находящихся в термонеutralных условиях. У крыс, устойчивых к холоду, по сравнению с неустойчивыми выявлены более низкие показатели свободной и относительной свободной активности отдельных ферментов, что отражает различия проницаемости мембран лизосом, имеющиеся у крыс с различной устойчивостью к холоду. Ключевые слова: активность лизосомных ферментов, устойчивость к холоду. Изучение механизмов индивидуальной устойчивости организма к неблагоприятному действию различных физических факторов имеет большое значение для человека. Одним из таких факторов, с которым человек сталкивается очень часто, является холод. Изучение механизмов устойчивости к холоду способствует разработке путей и методов ее повышения, а также формированию критериев профессионального отбора лиц для работы в условиях низких температур. Устойчивость человека и животных к холоду изменяется в широких пределах [7]. Показано, что имеются значительные внутривидовые различия между животными по устойчивости к холоду и другим стрессовым факторам [2,5]. В основе устойчивости организма к действию холода лежат многочисленные механизмы, реализующиеся как на уровне целостного организма, так и на клеточном уровне. В механизмах устойчивости к холоду на клеточном уровне важное значение имеют физико-химические свойства и проницаемость мембран, в том числе мембран лизосом [3,8]. От состояния мембран лизосом во многом зависит активность лизосомных ферментов в цитоплазме клетки, т.е. свободная активность [3].

Изменения состояния мембран лизосом и активности лизосомных ферментов печени являются составной частью механизмов повреждающего действия холода на организм. Ранее было установлено, что охлаждение животных приводит к возрастанию свободной активности ферментов лизосом в печени крыс [1,4]. При изучении динамики активности ряда кислых гидролаз лизосом печени в процессе острого охлаждения крыс с различной устойчивостью к холоду были выявлены значительные различия вызванных холодом изменений активности лизосомных ферментов между устойчивыми и неустойчивыми к холоду крысами [4]. Критерием устойчивости крыс к холоду служила скорость снижения ректальной температуры в стандартизованных условиях охлаждения. Оказалось, что неустойчивые к холоду животные отличаются значительно большим возрастанием свободной активности лизосомных ферментов уже в начале охлаждения; различия сохраняются и в динамике дальнейшего охлаждения. У устойчивых к холоду крыс по сравнению с неустойчивыми возрастание свободной активности

лизосомных ферментов печени появляется при более длительном охлаждении, и выражено в меньшей степени.

На основании полученных нами данных о различной динамике активности лизосомных ферментов печени в процессе охлаждения животных представляло интерес выяснить, имеются ли различия активности лизосомных ферментов у устойчивых и неустойчивых к холоду крыс в термонейтральных условиях. Особенности животных, связанные с различной индивидуальной устойчивостью к холоду, изучались в единичных работах. Так, например, показано, что у животных с различной устойчивостью к холоду имеются выявляемые в термонейтральных условиях различия метаболизма липидов и содержания их в отдельных тканях [2]. Данных об активности лизосомных ферментов печени у интактных животных с различной устойчивостью к холоду не имеется. В соответствии с этим целью нашей работы было изучение и сравнение активности исследуемых ферментов лизосом печени у устойчивых и неустойчивых к холоду крыс, находящихся в термонейтральных условиях.

Материал и методы

Исследования проведены на 26 беспородных белых крысах-самцах массой 180-200 г. Животные были предварительно разделены на группы наиболее устойчивых к холоду (устойчивые) и наименее устойчивых (неустойчивые). Для этого крысы подвергались охлаждению в течение 1 часа 20 минут в холодильной камере в специально подобранных условиях (температура воздуха 4°C, частичное погружение в воду с температурой 8°C, уровень воды 6 см). В конце периода охлаждения у крыс измеряли ректальную температуру электротермометром ТПЭМ-1 на глубине 4 см. У неустойчивых к холоду животных (n=13) ректальная температура составила в среднем $29,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$, устойчивые крысы (n=13) в тех же условиях поддерживали температуру $34,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Для минимизации последствий холодового стресса после однократного охлаждения отобранные крысы содержались в термонейтральных условиях на стандартном рационе вивария в течение 20 дней.

На момент исследования, проведенного через указанный период, ректальная температура крыс обеих опытных групп не отличалась. У крыс производили забор крови и получали ткань печени, предварительно перфузированной раствором сахарозы с ЭДТА, рН 7,4. Печень 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 гомогенате печени, содержащем неразрушенные лизосомы, общая активность определялась после добавления в гомогенат печени детергента тритон X-100, разрушающего мембраны лизосом, 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.

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

Результаты и обсуждение

Установлено, что общая активность изучаемых лизосомных ферментов в печени устойчивых и неустойчивых к холоду животных, находящихся в термонейтральных условиях, для большинства ферментов не отличается. Единственным исключением является общая активность кислой фосфатазы, которая оказалась на 17,8% ($p < 0,05$) выше у устойчивых к холоду крыс по сравнению с группой животных, неустойчивых к холоду.

Основные различия между двумя группами крыс обнаружены для свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов печени. Установлено, что у устойчивых к холоду крыс свободная активность некоторых лизосомных ферментов заметно ниже, чем у устойчивых. Так, свободная активность β -галактозидазы у устойчивых к холоду крыс на 24,4% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с тем же показателем неустойчивых животных, свободная активность ДНК-азы – ниже на 13,4% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 1).

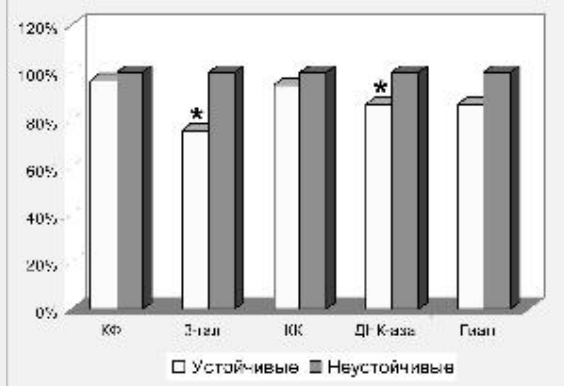


Рис.1. Свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс, находящихся в термонейтральных условиях (в % по отношению к неустойчивым): КФ – кислая фосфатаза, β -гал- β -галактозидаза, КК – кислые катепсины D, B1, гиал - гиалуронидаза

Показатели относительной свободной активности ряда лизосомных ферментов печени у устойчивых к холоду животных также оказались ниже по сравнению с группой неустойчивых. Опыты показали, что между двумя группами крыс имеются достоверные различия по показателям относительной свободной активности таких ферментов печени, как кислая фосфатаза и β -галактозидаза. Доля свободной активности в общей для кислой фосфатазы у устойчивых к холоду крыс составила 42,4%, в то время как у неустойчивых этот показатель составил 50,6% ($p < 0,05$). Относительная свободная активность β -галактозидазы в группе устойчивых к холоду крыс равна 33,1%, у неустойчивых – 43,3% ($p < 0,05$) (рис. 2). Следует отметить, что более низкая относительная свободная активность кислой фосфатазы у устойчивых к холоду крыс связана не с меньшей величиной свободной

активности, а с большей общей активностью фермента в печени крыс данной группы. Что же касается относительной свободной активности β -галактозидазы, то более низкая величина этого показателя у устойчивых к холоду крыс связана с более низкой активностью фермента вне лизосом, т.е. более низкой свободной активностью. Следовательно, одним из наиболее заметных отличий устойчивых к холоду крыс от неустойчивых является более низкая величина активности β -галактозидазы в печени, как свободной, так и относительной свободной.

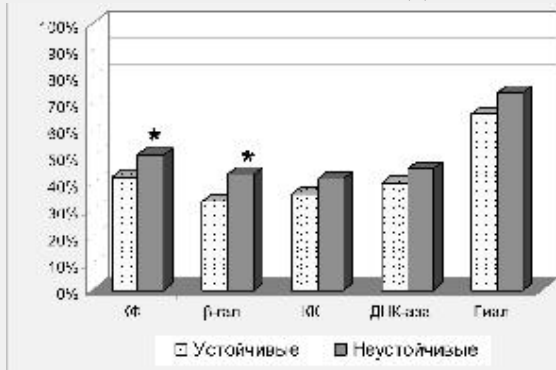


Рис.2. Относительная свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс, находящихся в термонейтральных условиях: КФ – кислая фосфатаза, β -гал- β -галактозидаза, КК – кислые катепсины D, B1, гиал - гиалуронидаза

При исследовании активности тех же ферментов в сыворотке крови крыс двух опытных групп обнаружено различие активности кислой фосфатазы и гиалуронидазы. Активность кислой фосфатазы в сыворотке устойчивых к холоду крыс была на 15,0%

($p < 0,05$) ниже, а активность гиалуронидазы – на 31,5%

($p < 0,01$) выше по сравнению с активностью фермента у неустойчивых к холоду животных.

Таким образом, интактные крысы, устойчивые к холоду, находящиеся в момент исследования в термонейтральных условиях, отличаются более низкой активностью ряда лизосомных ферментов печени и сыворотки крови по сравнению с группой неустойчивых к холоду животных. Анализ этих различий позволяет заключить, что они связаны не столько с разной активностью отдельных лизосомных ферментов, сколько с состоянием лизосомных мембран и их проницаемостью. опыты показали, что общая активность изучавшихся ферментов в печени крыс отличается незначительно, а основные различия между группами заключаются в величинах показателей свободной и относительной свободной активности, характеризующих количество кислых гидролаз, вышедших из лизосом. Следовательно, неустойчивые к холоду интактные крысы исходно, без действия холода и развития гипотермии, имеют более высокую проницаемость мембран лизосом для ряда лизосомных ферментов, в то время как у устойчивых к холоду крыс проницаемость мембран лизосом ниже.

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).* – Минск.: 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.