Т.Г. Северина, А.п. Кубарко

Влияние острой иммерсионной гипотермии на температуру тела и активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

Белорусский государственный медицинский университет

Изучены изменения температуры тела и активности лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при острой иммерсионной гипотермии. Установлено, что для крыс, устойчивых к холоду, по сравнению с неустойчивыми характерны более низкие показатели свободной и относительной свободной активности большинства лизосомных ферментов, что отражает бóльшую стабильность мембран лизосом печени устойчивых к холоду крыс при гипотермии.

Ключевые слова: активность лизосомных ферментов, иммерсионная гипотермия, устойчивость к холоду.

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, развивающаяся при полном или частичном погружении тела в холодную воду. Высокая теплоемкость воды значительно ускоряет процесс отдачи тепла, и даже при относительно небольшой разнице температуры тела и воды гипотермия развивается очень быстро.

Изучение механизмов устойчивости организма к холоду имеет большое социальное и медицинское значение для человека. Такие исследования способствуют разработке путей и методов повышения устойчивости к холоду, подходов при оказании помощи при переохлаждении, а также формированию критериев профессионального отбора лиц для работы в условиях низких температур.

Различают видовую и индивидуальную устойчивость животных к холоду. пндивидуальная устойчивость к холоду может быть врожденной и приобретенной. Ряд исследований посвящен изучению видовой устойчивости животных к холоду, в частности, животных, впадающих в спячку [8]. Другие исследования посвящены приобретенной устойчивости к холоду, формирующейся в процессе долговременной адаптации. В то же время механизмы различий врожденной индивидуальной устойчивости животных остаются малоизученными. Между тем именно врожденная индивидуальная устойчивость позволяет организму противостоять быстрому охлаждению при острой гипотермии, и особенно при иммерсионной гипотермии. Различия способности организма противостоять охлаждению могут быть весьма значительными. Так, например, из литературы известно, что при морских катастрофах у одних людей смерть от переохлаждения в воде наступала через 4-5 часов, а у некоторых – уже через полчаса. Все имеющиеся данные об устойчивости человека к острой иммерсионной гипотермии получены при анализе несчастных случаев; экспериментальные исследования этой проблемы могут быть выполнены только на животных.

Имеются отдельные работы, в которых показано, что у животных одного вида имеются значительные внутрипопуляционные различия устойчивости ко многим неблагоприятным факторам, в том числе и к холоду [3,5]. Получены данные о том, что у крыс, различающихся по устойчивости к холоду, имеются особенности метаболизма, в частности, метаболизма липидов [3].

В основе устойчивости организма к действию холода, как врожденной, так и приобретенной, 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

Репозиторий БГМУ

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 [2,4,9]. Однако данные о влиянии температуры на состояние мембран лизосом и активность лизосомных ферментов фрагментарны. пссследования преимущественно выполнены in vitro; имеются лишь единичные работы, в которых определяли активность одного или двух лизосомных ферментов в условиях общего охлаждения целостного организма. пссследований влияния охлаждения на активность лизосомных ферментов у животных, различающихся по устойчивости к холоду, не проводилось.

В соответствии с этим целью нашей работы явилось изучение влияния острой иммерсионной гипотермии на активность лизосомных ферментов печени и температуру тела устойчивых и неустойчивых к холоду крыс.

Для достижения поставленной цели было необходимо изучить особенности влияния острой иммерсионной гипотермии на степень и скорость снижения температуры тела у устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при различной продолжительности периодов охлаждения, а также определить показатели общей, свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов в печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при различной глубине гипотермии, вызванной их охлаждением в течение одинаковых периодов времени.

Материал и методы

пссследования проведены на 169 беспородных белых крысах-самцах массой 180-210 г. До проведения опытов животные содержались в виварии при температуре 20-22°С, что находится в пределах термонейтральной зоны для крыс. Опыты проводили преимущественно в осенне-зимний сезон и в строго определенное время суток (9-12 часов утра). Все эксперименты на животных проводились в соответствии с правилами проведения работ при использовании экспериментальных животных [7].

Методика острой иммерсионной гипотермии. Опыты проводились в специально оборудованной холодильной камере, в которой поддерживалась температура воздуха 5°С (±1°С). Крысы помещались в емкости с водой. Уровень воды составлял 4,5 см, температура воды 5°С (±1°С). Крысы находились в отдельных отсеках, по одному животному в отсеке. Животные могли стоять в воде, не плавая; подвижность их была ограничена небольшими размерами отсеков.

Разделение животных на группы устойчивых и неустойчивых к холоду проводилось в процессе охлаждения. Критерием для разделения служило различие ректальной температуры крыс после охлаждения в холодильной камере в стандартных условиях в течение одного и того же периода времени.

Влияние охлаждения на температуру тела и активность лизосомных ферментов печени крыс изучалось на протяжении фиксированных периодов времени. В первой серии экспериментов животные охлаждались в течение 1 часа 20 минут, во второй – 2 часа, в третьей – 2 часа 30 минут, и в четвертой серии экспериментов охлаждение крыс длилось 2 часа 40 минут.

Периоды охлаждения в данной экспериментальной модели гипотермии выбраны в соответствии с температурой неустойчивых к холоду крыс после охлаждения. Так, в каждой серии опытов неустойчивые к холоду животные последовательно достигали гипотермии около 30°С (охлаждение в течение 1 часа 20 минут), затем 25°С (2 часа), 20°С (2 часа 30 минут) и 16°С (2 часа 40 минут) (см. результаты).

Репозиторий БГМУ

Критерием для отбора устойчивых к холоду животных на первой стадии охлаждения служило поддержание в тех же условиях ректальной температуры на 4-5°С выше по сравнению с неустойчивыми; на последующих стадиях охлаждения эта разность температуры между устойчивыми и неустойчивыми к холоду крысами возрастала.

Для каждой из перечисленных серий экспериментов в качестве контрольной группы брали интактных животных, не подвергавшихся охлаждению. псходная температура контрольных животных и крыс опытных групп до начала охлаждения не отличалась.

После охлаждения в течение стандартного времени и измерения ректальной температуры животных производили декапитацию животных и взятие ткани печени для исследования.

Получение гомогенатов печени крыс. Немедленно после декапитации производили перфузию печени крысы 0,3 М раствором сахарозы с ЭДТА (в конечной концентрации 1 мМ/л), pH 7,4, через портальную вену, после чего образец ткани печени (1 г) тщательно измельчали и гомогенизировали в течение 1 минуты в растворе сахарозы в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком. пз гомогенизированной ткани печени готовили 10% гомогенаты в растворе сахарозы.

Определение активности лизосомных ферментов. В гомогенатах печени изучали свободную и общую активность активность лизосомных ферментов кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2), b-галактозидазы (КФ 3.2.1.23), кислых катепсинов D,B1 (КФ 3.4.23.5; КФ 3.4.22.1), ДНК-азы (КФ 3.1.4.6) и гиалуронидазы (КФ 3.2.1.35) [5]. Свободная активность ферментов определялась в гомогенате печени, содержащем неразрушенные лизосомы, после инкубации с субстратом при 37°С; общая активность определялась тем же способом после добавления в гомогенат печени детергента тритон Х-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.

Активность кислой фосфатазы изучалась методом B. Spencer (1959), β-D-галактозидазы – методом J. Conchie et al. (1959), в модификации Н.А. Юсиповой [6]. Активность кислых катепсинов D, B1 определяли методом, описанным Покровским А.А. и А.п. Арчаковым (1968), ДНК-азы – методом, описанным А.Дж. Барретом и М.Ф. Хитом (1980), гиалуронидазы – методом Виха и соавт. (1973).

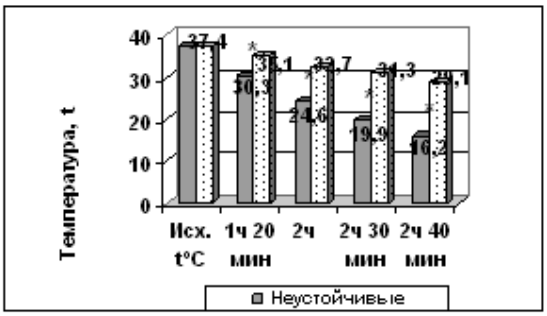
Полученные результаты обработаны методами параметрической статистики и представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического (± sx). Достоверность различий оценивали по критерию t Стьюдента; при проведении сравнений между показателями трех экспериментальных групп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

Результаты и обсуждение

Температура тела устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при гипотермии. Опыты показали, что у крыс с различной устойчивостью к холоду величина снижения ректальной температуры при охлаждении значительно отличается (рис. 1). По мере возрастания продолжительности охлаждения у всех животных происходит снижение ректальной температуры, но снижение температуры у крыс, неустойчивых к холоду, происходит значительно быстрее, чем у устойчивых к холоду животных. Это приводит к возрастанию различий температуры тела, наблюдаемых последовательно на каждой стадии охлаждения. Так, если в первой серии экспериментов различие средней температуры тела у животных с различной устойчивостью к холоду составило 4,8°С, то в последующих сериях

Репозиторий БГМУ

экспериментов при увеличении продолжительности охлаждения эта разность температур возрастает: 8,1°С (охлаждение в течение 2 часов), затем 11,4°С (2 часа 30 минут), и наконец, 12,9°С (2 часа 40 минут).



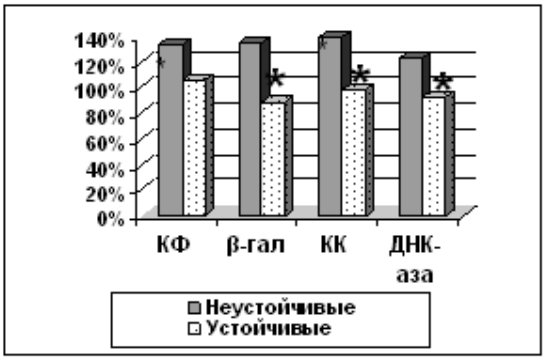
* - достоверность различий между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс; во всех случаях $p < 0,001$

Рис. 1. Ректальная температура устойчивых и неустойчивых к холоду крыс на каждой стадии охлаждения

Активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс. Эксперименты показали, что охлаждение животных приводит к возрастанию свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов печени крыс, при этом общая активность ферментов не изменяется или изменяется в меньшей степени. Однако вызванные острой иммерсионной гипотермией изменения активности лизосомных ферментов у устойчивых и неустойчивых к холоду крыс существенно отличаются. Установлено, что неустойчивые к холоду животные отличаются значительно бóльшим возрастанием свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов уже в начале охлаждения; различия сохраняются и при дальнейшем охлаждении. У устойчивых к холоду крыс по сравнению с неустойчивыми возрастание свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов печени появляется при более длительном охлаждении, и выражено в меньшей степени.

Так, охлаждение неустойчивых к холоду крыс (n=9) в течение 1 часа 20 минут, приводящее к развитию у них умеренной гипотермии (до 30,3 ± 0,13°С), сопровождается значительным возрастанием относительной свободной активности лизосомных ферментов печени: кислых катепсинов – в 1,4 раза выше ($p < 0,005$), и кислой фосфатазы – в 1,34 раза выше ($p < 0,05$) по сравнению с активностью этих ферментов у интактных контрольных животных (n=10). По сравнению с устойчивыми к холоду животными (n=10), у крыс, неустойчивых к холоду, относительная свободная активность β-галактозидазы в 1,5 раза выше ($p < 0,02$), кислых катепсинов – в 1,4 раза выше ($p < 0,02$), и ДНК-азы – в 1,33 раза выше ($p < 0,05$) (рис. 2). У устойчивых к холоду крыс при той же продолжительности охлаждения, приводящего к развитию у них легкой гипотермии (до 35,1 ± 0,13°С), активность лизосомных ферментов в печени животных не изменяется. У крыс этой группы при охлаждении в течение 1 часа 20 минут показатели как общей, так и свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов печени не отличаются от контроля.

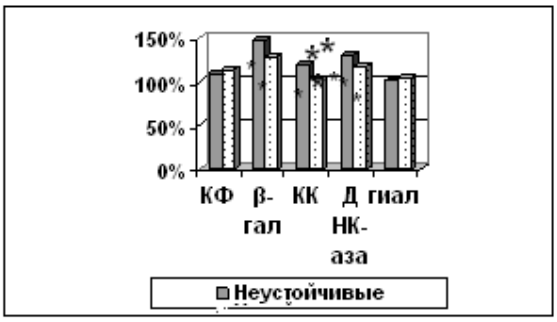
Репозиторий БГМУ



КФ – кислая фосфатаза, b-гал – b-галактозидаза, КК – кислые катепсины D,B1; * - достоверное отличие от контроля; * - достоверное различие между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

Рис. 2. Относительная свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при охлаждении в течение 1 часа 20 минут, в процентах
к тем же показателям интактных контрольных крыс

Опыты показали, что при охлаждении в течение 2 часов 30 минут у неустойчивых к холоду животных повышается свободная и относительная свободная активность большинства изучаемых ферментов печени. У крыс, устойчивых к холоду, возрастают только показатели относительной свободной активности b-галактозидазы и ДНК-азы, причем это изменение выражено в меньшей степени. Так, на данной стадии охлаждения у неустойчивых к холоду крыс (n=14), по сравнению с устойчивыми (n=18), относительная свободная активность b-галактозидазы в 1,15 раза выше ($p < 0,05$), ДНК-азы - в 1,11 раза выше ($p < 0,05$), кислых катепсинов - 1,15 раза выше ($p < 0,05$) (рис. 3).

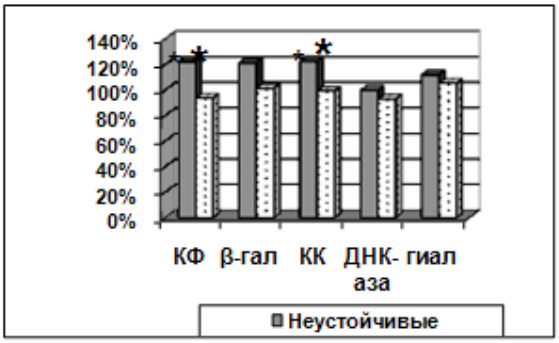


КФ – кислая фосфатаза, b-гал - b-галактозидаза, КК – кислые катепсины D,B1, гиал – гиалуронидаза; * - достоверное отличие от контроля; * - достоверное различие между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

Рис 3. Относительная свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при охлаждении в течение 2 часа 30 минут, в процентах
к тем же показателям интактных контрольных крыс.

При продолжительности охлаждении 2 часа 40 минут относительная свободная активность лизосомных ферментов печени у крыс, устойчивых к холоду, не отличается от контроля. У крыс, неустойчивых к холоду, повышена относительная свободная активность кислой фосфатазы и кислых катепсинов, как по сравнению с контролем, так и по сравнению с устойчивыми к холоду животными. Так, у неустойчивых к холоду крыс (n=14) по сравнению с устойчивыми (n=16) относительная свободная активность кислой фосфатазы в печени в 1,31 раза выше ($p < 0,005$), кислых катепсинов - в 1,24 раза выше ($p < 0,05$) (рис. 4).

Репозиторий БГМУ



КФ – кислая фосфатаза, b-гал - b-галактозидаза, КК – кислые катепсины D,B1, гиал – гиалуронидаза; * - достоверное отличие от контроля; * - достоверное различие между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

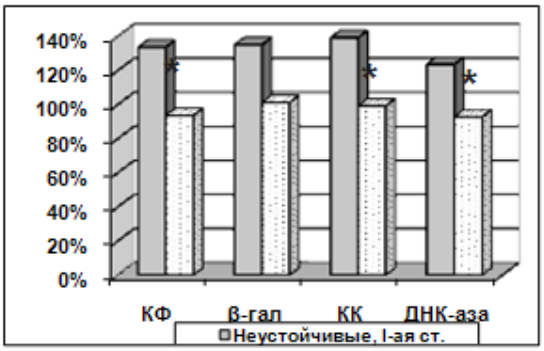
Рис. 4. Относительная свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при охлаждении в течение 2 часа 40 минут, в процентах
к тем же показателям интактных контрольных крыс

Таким образом, во всех сериях опытов с охлаждением у крыс, неустойчивых к холоду, выявлено повышение свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов печени, в то время как у устойчивых к холоду крыс эти изменения отсутствовали или были выражены в меньшей степени. Поскольку возрастание свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов расценивается как повышение проницаемости лизосомных мембран [4,6], полученные результаты свидетельствуют о том, что у крыс, неустойчивых к холоду, острая иммерсионная гипотермия приводит к повышению проницаемости лизосомных мембран печени для лизосомных ферментов. У устойчивых к холоду животных при такой же продолжительности периодов охлаждения выявлены более низкие показатели относительной свободной активности тех же ферментов, что отражает меньшую степень повышения проницаемости мембран лизосом печени при острой иммерсионной гипотермии у этой группы животных.

Поскольку при равной продолжительности охлаждения температура тела сравниваемых животных отличалась, можно предположить, что одной из причин меньшей проницаемости мембран лизосом печени у крыс, устойчивых к холоду, является меньшая степень гипотермии. Для проверки этого предположения необходимо провести сравнение активности лизосомных ферментов у устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при близкой ректальной температуре. Такое сравнение можно провести между неустойчивыми к холоду крысами после охлаждения в течение 1 часа 20 минут, когда их ректальная температура составляет 30,3° ± 0,13°С, и устойчивыми к холоду животными после охлаждения в течение 2 часов 40 минут, когда их средняя ректальная температура равна 29,1° ± 0,42°С. Сравнение показывает, что и при приблизительно одинаковом уровне гипотермии между двумя группами животных имеются значительные различия относительной свободной активности лизосомных ферментов печени.

Так, относительная свободная активность кислой фосфатазы у крыс, неустойчивых к холоду (при охлаждении в течение 1 часа 20 минут), в 1,43 раза выше ($p<0,01$) по сравнению с устойчивыми к холоду крысами, когда при вдвое большей продолжительности охлаждения они достигают приблизительно того же уровня гипотермии. Относительная свободная активность кислых катепсинов при таком же сравнении у неустойчивых к холоду крыс оказывается в 1,4 раза выше ($p<0,001$), и относительная активность ДНК-азы – в 1,33 раза выше ($p<0,001$) по сравнению с устойчивыми к холоду животными (рис. 5).

Репозиторий БГМУ



КФ – кислая фосфатаза, b-гал - b-галактозидаза, КК – кислые катепсины D,B1; * - достоверное различие между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

Рис. 5. Относительная свободная активность лизосомных ферментов печени крыс, устойчивых к холоду, при охлаждении в течение 1 часа 20 минут, и крыс, неустойчивых к холоду,
при охлаждении в течение 2 часов 40 минут, в процентах к относительной свободной активности тех же ферментов печени интактных контрольных крыс

Данное сравнение показывает, что различия между устойчивыми и неустойчивыми к холоду животными обусловлены не только тем, что их ректальная температура при охлаждении в течение равных периодов времени отличается. Более низкая относительная свободная активность лизосомных ферментов печени у устойчивых к холоду крыс по сравнению с неустойчивыми при приблизительно одинаковом уровне гипотермии свидетельствует о том, что бóльшая стабильность мембран лизосом у группы животных вызвана не просто различием температуры тела, а связана с другими причинами, например, с особенностями изменений метаболизма при охлаждении.

Таким образом, установлено, что острая иммерсионная гипотермия вызывает у крыс снижение ректальной температуры и повышение свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов печени, более выраженное у животных, неустойчивых к холоду. По сравнению с неустойчивыми к холоду крысами, для устойчивых к холоду животных при острой иммерсионной гипотермии характерна бóльшая стабильность мембран лизосом печени, как при равной продолжительности охлаждения, так и при приблизительно равной температуре тела.

Литература

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с.

2. Горошинская, п. А. Биохимические показатели дифференцировки холодового стресса и адаптации / п. А. Горошинская [и др.] // Вопр. мед. химии. 1987. № 4. С. 62–65.

3. Застенская, п. А. Роль липидов в механизмах гипотермии и естественной терморе- зистентности / п. А. Застенская // Нарушение механизмов регуляции и их коррекция: тез. докл. IV Всесоюз. съезда патофизиологов, Кишинев, 3–6 окт. 1989 г. М., 1989. Т. 2. С. 589.

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

5. Тимочко, М. Ф. О некоторых биохимических механизмах жизнеобеспечения высокорезистентных животных / М. Ф. Тимочко, Я. п. Алексеева, Ю. Г. Бобков // Пат. физиол. и эксп. тер. 1991. № 2. С. 28–29.

Репозиторий БГМУ

6. Юсипова, Н. А. Гидролитические ферменты биологических жидкостей и скелетной мышцы белых крыс с адъювантным артритом / Н. А. Юсипова // Вопр. мед. хим. 1978. № 3. С. 362–368.

7. Council of Europe. Educational and Training Needs of Those Working with Laboratory Animals. Guideline Document. Brussels, 1992. P. 5.

8. 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.

9. Zhang, G.J. Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability / G.J. Zhang [et al.] // J. Membr. Biol. 2000. Vol. 175 (1). P. 53–62

Репозиторий БГМУ