

**Показатели проницаемости лизосомных мембран печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при гипо- и нормотермии**

*Белорусский государственный медицинский университет*

У устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при гипотермии и нормальной температуре тела изучена проницаемость лизосомных мембран печени, оцениваемая по относительной свободной активности ферментов. Установлено, что устойчивые к холоду крысы по сравнению с неустойчивыми характеризуются более низкой проницаемостью лизосомных мембран печени как при гипо-, так и при нормотермии. Показано, что устойчивые к холоду животные имеют более низкую активность кислой фосфатазы в сыворотке крови, что может служить одним из предикторов устойчивости к холоду.

Ключевые слова: устойчивость к холоду, проницаемость лизосомных мембран, активность лизосомных ферментов.

Всестороннее изучение механизмов устойчивости организма к холоду имеет большое социальное и медицинское значение. Выявление особенностей ответа организма устойчивых к холоду животных на охлаждение позволяет разрабатывать подходы к повышению устойчивости человека к холоду. Важным аспектом этой проблемы является выявление показателей, позволяющих с той или иной вероятностью определять степень устойчивости организма к холоду без охлаждения. Такие показатели могут использоваться при отборе лиц для работы в условиях низких температур с повышенным риском переохлаждения.

Известно, что одним из важнейших факторов, обеспечивающих способность организма противостоять действию холода, является сохранение функциональных свойств мембран в условиях действия низких температур [3,6,8,9,10]. При охлаждении нарушается нормальное жидкокристаллическое состояние липидов мембраны, что, в свою очередь, может приводить к нарушению функционирования мембранных белков, в том числе ферментов, насосов, переносчиков. Так, имеются данные о том, что при возникающем под действием низких температур переходе мембранных липидов в состояние геля мембранные белки могут выталкиваться из липидного бислоя [3, 6, 9]. При развитии гипотермии в мембране происходит расширение и кластеризация доменов с повышенной ригидностью, что постепенно приводит к латеральному сжатию белков и последующему их выталкиванию из мембраны. В результате мембраны, лишенные значительной части белков, не могут нормально функционировать и обеспечивать потребности клетки в транспорте веществ и энергии.

Повреждающее действие холода может проявляться не только в нарушении структуры и функции плазматической мембраны, но и мембран клеточных органелл. Повреждение таких мембран, как лизосомные, является важной частью мембранных нарушений при действии холода. Повышение проницаемости лизосомных мембран и возрастание активности гидролитических лизосомных ферментов в цитоплазме клетки является важным звеном повреждения клетки при действии различных неблагоприятных факторов [4]. Поддержание стабильного состояния лизосомных мембран играет важную роль для сохранения функций клетки и организма в целом в условиях действия различных повреждающих факторов, в том числе в условиях охлаждения. Однако проницаемость лизосомных мембран при охлаждении крыс с различной индивидуальной устойчивостью к холоду не изучена.

Индивидуальная устойчивость организма к холоду зависит от множества факторов, в том числе от возраста, пола, массы тела, количества жировой ткани, интенсивности

обменных процессов и т.д. Однако даже при отсутствии морфологических и возрастных различий устойчивость организма к холоду может быть различной. В наших экспериментах ранее 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 [5]. Возможно, индивидуальные различия способности поддерживать температуру тела в условиях охлаждения связаны с особенностями, которые реализуются на уровне клетки, и в том числе на уровне мембран. Однако вопрос о том, участвуют ли мембранные механизмы в обеспечении врожденной индивидуальной устойчивости к охлаждению, остается неизученным. Так, в литературе имеются отдельные сведения о различиях липидного состава тканей у животных с различной устойчивостью к холоду при нормотермии [2]. Однако функциональные свойства клеточных мембран, в частности, проницаемость мембран лизосом, у животных, отличающихся по индивидуальной устойчивости к холоду, при нормальной температуре тела, как и при гипотермии, до настоящего времени не изучены.

В соответствии с этой целью нашей работы было изучение показателей проницаемости лизосомных мембран печени у устойчивых и неустойчивых к холоду крыс в условиях гипо- и нормотермии.

#### Материал и методы

Опыты проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 180-210 г. Разделение животных на наиболее устойчивых к холоду (устойчивые) и наименее устойчивых (неустойчивые) проводилось непосредственно в процессе охлаждения. Охлаждение проводилось течение 1 часа 20 минут в холодильной камере в специально подобранных стандартизированных условиях (температура воздуха  $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , частичное погружение в воду, температура воды  $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , уровень воды 4,5 см). Исходная температура тела животных не отличалась. В конце периода охлаждения у крыс измеряли ректальную температуру электротермометром ТПЭМ-1 на глубине 4 см. В группу крыс, неустойчивых к холоду, отбирали животных, температура тела которых за указанный период снижалась в среднем до  $30^{\circ}\text{C}$ , то есть до  $31^{\circ}\text{C}$  и ниже. В группу устойчивых к холоду крыс отбирали животных, которые в тех же условиях охлаждения поддерживали температуру на  $4-5^{\circ}\text{C}$  выше, т.е.  $34-35^{\circ}\text{C}$  и выше. Крыс с промежуточными значениями температуры тела в опыт не отбирали.

В первой серии экспериментов изучали показатели проницаемости лизосомных мембран при гипотермии. Животных в конце периода охлаждения сразу после измерения температуры декапитуировали и получали гомогенаты печени. Печень перфузировали раствором сахарозы с ЭДТА, рН 7,4, через канюлю, введенную в надраз в портальной вене. Навеску печени, 1 г, тщательно измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком, и получали 10% гомогенаты в растворе сахарозы. Все процедуры приготовления гомогенатов печени проводились в условиях холодильной камеры при  $5^{\circ}\text{C}$ .

В другой серии экспериментов для изучения показателей проницаемости лизосомных мембран при нормотермии крыс также подвергали охлаждению в течение 1 часа 20 минут с целью разделения на устойчивых и неустойчивых к холоду. Ректальная температура крыс, отобранных в группу неустойчивых к холоду животных, составила в среднем  $29,1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  ( $n=13$ ). Температура тела крыс, устойчивых к холоду, при охлаждении в тех же условиях составила  $34,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  ( $n=13$ );  $p < 0,001$ . При этом масса тела крыс не отличалась:  $191,2 \pm 4,9$  г и  $195,4 \pm 4,0$  г соответственно; не отличались пол, возраст крыс и условия содержания. Для минимизации последствий холодового стресса после однократного охлаждения отобранные крысы в течение 15 дней содержались в термонейтральных условиях на

стандартном рационе вивария. Затем животные обеих групп были декапитированы при комнатной температуре. На момент исследования температура тела крыс обеих групп не отличалась. У крыс производили забор ткани печени, а также крови, из которой получали сыворотку.

Для оценки проницаемости мембран лизосом печени использовали показатель относительной свободной активности лизосомных ферментов, т.е. долю свободной активности ферментов в общей, выраженной в процентах [4]. С целью поиска показателей, получаемых малоинвазивными методами и отражающих индивидуальную устойчивость животных к холоду, также исследовали активность лизосомных ферментов в сыворотке крови. В гомогенатах печени и сыворотке крови крыс определяли активность лизосомных ферментов кислой фосфатазы,  $\beta$ -галактозидазы, кислых катепсинов D, B1, ДНК-азы и гиалуронидазы [7]. 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.

Активность кислой фосфатазы изучали методом В. Spencer (1959),  $\beta$ -D-галактозидазы – методом J. Conchie et al. (1959), в модификации Н.А. Юсиповой [7]. 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).

Результаты обработаны методами параметрической статистики. Достоверность различий между показателями двух экспериментальных групп оценивали по критерию t Стьюдента, при сравнении показателей трех групп использовали критерий t Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений [1]. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

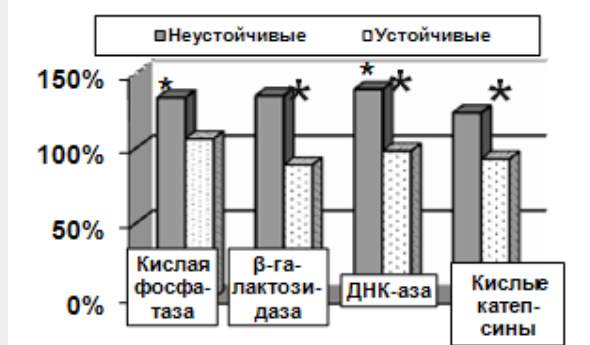
#### Результаты и обсуждение

Температура тела устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при гипотермии. В первой серии экспериментов температура тела крыс, отобранных в группу неустойчивых к холоду животных (масса тела  $193,3 \pm 4,5$  г), составила в среднем  $30,3 \pm 0,13^\circ\text{C}$  ( $n=9$ ). Температура тела крыс, устойчивых к холоду (масса тела  $199,7 \pm 2,5$  г), при охлаждении в тех же условиях составила  $35,1 \pm 0,13^\circ\text{C}$  ( $n=10$ ). Таким образом, при охлаждении устойчивых и неустойчивых к холоду крыс в одинаковых условиях в течение 1 часа 20 минут различие их средней ректальной температуры составляет  $4,8^\circ\text{C}$  ( $p < 0,001$ ). В качестве контроля использовали группу крыс, не подвергавшихся охлаждению ( $37,3 \pm 0,10^\circ\text{C}$ ,  $n=10$ ).

Активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при гипотермии. Опыты показали, что общая активность изучаемых ферментов печени при охлаждении устойчивых и неустойчивых к холоду крыс в течение 1 часа 20 минут достоверно не отличается, а также не отличается от общей активности тех же ферментов у контрольных животных. Установлено, что охлаждение животных с различной устойчивостью к холоду в течение 1 часа 20 минут приводит к существенным различиям показателей относительной свободной активности большинства изучаемых лизосомных ферментов. Так, охлаждение неустойчивых к холоду крыс приводит к повышению относительной свободной активности кислой фосфатазы в печени в 1,34 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с этим показателем у контрольных крыс. Охлаждение крыс, устойчивых к холоду, не приводит к изменению данного показателя, который не отличается от показателя контрольных крыс. Относительная свободная активность  $\beta$ -галактозидазы в печени

неустойчивых к холоду крыс в 1,5 раза выше ( $p < 0,02$ ) по сравнению с этим показателем у устойчивых к холоду крыс при их охлаждении в течение того же периода времени. Относительная свободная активность кислых катепсинов в печени неустойчивых к холоду крыс при охлаждении повышается в 1,4 раза ( $p < 0,005$ ) по сравнению с контрольными животными. В то же время у устойчивых к холоду крыс относительная свободная активность фермента не отличается от контроля. По сравнению с устойчивыми к холоду крысами относительная свободная активность кислых катепсинов у животных, неустойчивых к холоду, повышена в 1,4 раза ( $p < 0,02$ ). Относительная свободная активность ДНК-азы в печени неустойчивых к холоду крыс по сравнению с устойчивыми к холоду животными повышена в 1,33 раза ( $p < 0,05$ ).

Результаты исследования относительной свободной активности лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при гипотермии представлены на рисунке 1.



$^{1/4}/p>$

Рис. 1. Относительная свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при охлаждении, в процентах к относительной свободной активности тех же ферментов печени интактных контрольных крыс

\* - достоверное отличие от контроля; \* - достоверное различие между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

Эти данные свидетельствуют о том, что у крыс, неустойчивых к холоду, умеренная гипотермия приводит к повышению проницаемости лизосомных мембран печени, в результате чего и возрастает относительная свободная активность этих ферментов. У устойчивых к холоду животных при той же продолжительности охлаждения проницаемость мембран лизосом сохраняется на более низком уровне. Устойчивые к холоду животные в тех же условиях охлаждения характеризуются не только поддержанием более высокой температуры тела, но и большей стабильностью лизосомных мембран.

Температура тела устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при нормотермии. На момент проведения исследования ректальная температура устойчивых и неустойчивых к холоду крыс не отличалась ( $p < 0,2$ ) и составила  $37,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$  и  $36,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , соответственно.

Активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при нормотермии. Опыты показали, что при комнатной температуре содержания животных и нормальной температуре тела общая активность изучаемых ферментов печени у устойчивых и у неустойчивых к холоду крыс практически не отличается.

При исследовании свободной и относительной свободной активности лизосомных ферментов печени выявлены различия этих показателей между устойчивыми и неустойчивыми к холоду крысами. Установлено, что у устойчивых к холоду крыс свободная активность некоторых лизосомных ферментов заметно ниже, чем у устойчивых.

Так, свободная активность  $\beta$ -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. 2).



Рис. 2. Свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при нормотермии (за 100 % приняты показатели крыс, неустойчивых к холоду)

\* - достоверное различие между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

При исследовании относительной свободной активности лизосомных ферментов печени установлено, что устойчивые к холоду животные по сравнению с неустойчивыми к холоду крысами характеризуются и более низкими показателями относительной свободной активности отдельных лизосомных ферментов печени.

Опыты показали, что между двумя группами крыс имеются достоверные различия по показателям относительной свободной активности таких ферментов печени, как кислая фосфатаза и  $\beta$ -галактозидаза. У устойчивых к холоду животных при нормальной температуре тела, в термонеutralных условиях относительная свободная активность кислой фосфатазы в печени в 1,2 раза ниже ( $p < 0,05$ ) по сравнению с неустойчивыми. Относительная свободная активность  $\beta$ -галактозидазы в печени устойчивых к холоду крыс в 1,31 раза ниже ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными, неустойчивыми к холоду.

Активность других изучаемых лизосомных ферментов печени у крыс, устойчивых и неустойчивых к холоду, не отличается.

Результаты исследования относительной свободной активности лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при нормотермии представлены на рисунке 3.



Рис. 3. Относительная свободная активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при нормотермии (за 100 % приняты показатели крыс, неустойчивых к холоду)

\* - достоверное различие между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс

Активность лизосомных ферментов в сыворотке крови устойчивых и неустойчивых к холоду крыс. При исследовании активности тех же ферментов в сыворотке крови крыс двух опытных групп обнаружено различие активности кислой фосфатазы. Активность кислой

фосфатазы в сыворотке крови крыс, неустойчивых к холоду, составила  $31,19 \pm 1,54 \times 10^{-1}$  мкМ/мл·час. У устойчивых к холоду крыс данный показатель составляет  $26,52 \pm 1,63 \times 10^{-1}$  мкМ/мл·час. Активность кислой фосфатазы в сыворотке крови устойчивых к холоду крыс на 15% ниже по сравнению с неустойчивыми к холоду животными ( $p < 0,05$ ). Более низкая активность фермента в сыворотке может быть следствием более низкой проницаемости мембран лизосом у устойчивых к холоду крыс.

Таким образом, устойчивые к холоду крысы при нормальной температуре тела отличаются более низкой свободной 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 проницаемостью лизосомных мембран. Так как общая активность изучавшихся ферментов в печени крыс не отличается, основные различия между группами, которые заключаются в величинах показателей свободной и относительной свободной активности, характеризуют прежде всего степень проницаемости мембран лизосом [3]. Следовательно, неустойчивые к холоду крысы исходно, при нормальной температуре тела, имеют более высокую проницаемость мембран лизосом печени для ряда лизосомных ферментов, в то время как у устойчивых к холоду крыс при нормотермии проницаемость мембран лизосом печени ниже. Можно предположить, что более высокая стабильность мембран лизосом является одним из факторов, позволяющим устойчивым к холоду животным поддерживать внутриклеточные процессы, лежащие в основе сохранения более высокой температуры тела в процессе охлаждения.

#### Выводы

1. Устойчивые к холоду животные по сравнению с неустойчивыми поддерживают более высокую температуру тела и характеризуются более низкой проницаемостью лизосомных мембран печени при гипотермии, развивающейся в одинаковых условиях охлаждения, что проявляется более низкими показателями относительной свободной активности лизосомных ферментов печени.

2. Устойчивые к холоду животные имеют более низкую проницаемость лизосомных мембран печени и без охлаждения, при нормальной температуре тела.

3. Устойчивые к холоду животные при нормальной температуре тела характеризуются более низкой активностью кислой фосфатазы в сыворотке крови по сравнению с неустойчивыми.

4. Уровень активности кислой фосфатазы в сыворотке крови может быть одним из вероятных предикторов индивидуальной устойчивости животных к действию холода.

#### Литература

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

2. Застенская, п. А. Роль липидов в механизмах гипотермии и естественной терморезистентности / 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.

3. Крепс, Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов / Е. М. Крепс. Л.: Наука, 1981. 339 с.

4. Панин, Л. Е. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении / Л. Е. Панин, Н. Н. Маянская. Новосибирск: Наука, 1987. 197 с.

5. Северина, Т. Г. Динамика снижения ректальной температуры в процессе общего охлаждения крыс с различной устойчивостью к холоду / Т. Г. Северина // Достижения фун-

даментальной, 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.

6. Тимофеев, Н. Н. Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма / Н. Н. Тимофеев, Л. П. Прокопьева. М.: Медицина, 1997. 208 с.

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

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. Wunderlich, F. Thermotropic lipid clustering in Tetrahymena membranes / F. Wunderlich [et al.] // Biochemistry. 1975. V. 14. № 17. P. 3730–3735.

10. 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