

УДК 577.150: 612. 57

©Коллектив авторов

## АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ВВЕДЕНИИ ДАЛАРГИНА

*С. П. Львова, Е. М. Абаева, А. Г. Гасангаджиева, И. К. Михайленко*

НИИ биологии Дагестанского государственного университета,  
367025 Республика Дагестан, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева 43а  
Тел.: (8722)682326, факс: (8722)682326, 682332, Эл. почта: root@eldaggu.dagestan.su

Исследовали суммарную антиокислительную активность, активность водорастворимой фракции антиокислительной системы, супероксиддисмутазы и каталазы в мозге, печени, миокарде, скелетной мышце, почках, сыворотке крови при гипотермии 30°C и 20°C, а также при самосогревании с 20°C до 37°C. Активность антиоксидантной системы поддерживается на высоком уровне, исключая супероксиддисмутазу. Последняя значительно активизируется при гипотермии 30°C, пролонгированной 3 часа. Инъекция даларгина за 30 мин до начала охлаждения стабилизирует мембрану эритроцитов, не повышая антиоксидантной активности в большинстве изученных органов.

**Ключевые слова:** гипотермия, даларгин, супероксиддисмутаза, каталаза, неферментативные антиоксиданты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Интенсивность процессов перекисного окисления липидов, существенно модифицирующих биологические мембраны, определяется соотношением скорости генерации свободных радикалов кислорода и "емкостью" антиоксидантной системы.

Стрессы разной этиологии усиливают генерацию свободных радикалов кислорода [1,2]. Степень активизации процессов перекисного окисления липидов при этом будет зависеть от интенсивности стрессорного воздействия, липидного спектра и степени ненасыщенности мембранных липидов, состояния антиоксидантной системы.

Ранее нами было установлено [3], что интенсивность перекисного окисления липидов в тканях теплокровного организма существенно изменяется в динамике гипотермии. Фармакологический препарат даларгин (аналог лей-энкефалина) ингибирует процесс пероксидации мембранных липидов при глубокой гипотермии.

В данной работе исследовали активность компонентов антиоксидантной системы в тканях белых крыс в динамике гипотермии и при самосогревании, а также при введении опиоидного пептида даларгина.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали самцов белых крыс в возрасте 3-4 месяца. Исследовали состояние умеренной гипотермии (30°C) и глубокой (20°C) гипотермии. Животных охлаждали в холодной воде (+7-10°C) до 30°C за 15-20 мин, до 20°C - за 45-60 мин. Самосогревание животных после глубокой гипотермии до 37°C проводили при комнатной температуре за 1,5-2 часа.

Суммарную антиокислительную активность тканей определяли в модельных опытах с линоленовой кислотой [4] по степени торможения ее перекисного окисления гомогенатами тканей и сывороткой крови за час инкубации при 37°C.

Определение активности водорастворимой фракции антиоксидантной системы в тканях проводили по методу [5]. В его основе лежит исследование кинетики окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолинидофенолята натрия кислородом воздуха в присутствии водной вытяжки тканей. Активность выражали в константе ингибирования ( $K_{in}$ ) биологическим материалом окисления вышеназванного красителя.

Определение активности каталазы и супероксиддисмутазы проводили при 25°C в гомогенатах тканей после осаждения митохондрий. Каталазу определяли по Королюку с соавт. [6]. Активность выражали в мкмоль  $H_2O_2$ /мг белка/мин. Расчеты  $H_2O_2$  проводили на основе калибровочной кривой. Об активности супероксиддисмутазы судили по ингибированию восстановления нитротетразолиевого синего [7]. Активность выражали в усл.ед/мг белка.

Влияние даларгина на антиоксидантную активность тканей исследовали при его внутрибрюшинном введении в концентрации 100 мкг/кг веса за 30 мин до начала охлаждения животного.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Суммарная активность тканей на всех этапах гипотермии, в том числе пролонгированной 3 часа умеренной (30°C) гипотермии, поддерживается на более высоком уровне, чем в контроле (табл.1).

Таблица 1. Суммарная антиокислительная активность в тканях крыс при гипотермии.

Вариант опыта	Мозг	Печень	Почка	Миокард	Икроножная мышца	Сыворотка крови
Нормотермия 37°C	69,9±3,4	70,2±6,7	67,6±1,2	75,4±5,0	83,4±1,3	46,6±2,8
Гипотермия 30°C	94,9*±0,6	90,9*±0,8	92,4*±0,8	92,0*±2,0	93,7*±0,8	79,9*±3,0
Гипотермия 30°C 3 часа	83,5*±1,1	85,3±3,8	89,0*±2,0	86,8±3,9	91,5*±1,9	79,8*±1,4
Гипотермия 20°C	85,0*±2,3	87,7±3,8	87,0*±4,0	98,0*±0,6	92,0*±2,3	78,0*±3,7
Гипотермия 20°C +даларгин	65,0**±3,1	70,7**±2,8	84,6±3,5	95,2±0,8	94,0±0,9	92,7**±1,5
Самосогревание с 20°C до 37°C	79,3±5,6	79,4±0,3	89,3*±1,9	87,3±2,1	93,7*±1,2	70,7*±1,7

Примечание: Результаты выражены в %, здесь и в таблицах 2-4 одной звездочкой (\*) помечены достоверные ( $P<0,05$ ) изменения по сравнению с нормотермией, двумя (\*\*) - достоверные изменения по сравнению с гипотермией 20°C без введения даларгина. Представлены средние значения ( $\pm m$ ) 6-7 опытов.

Таблица 2. Активность водорастворимой фракции антиоксидантной системы в тканях крыс при гипотермии.

Вариант опыта	Мозг	Печень	Икроножная мышца	Сыворотка крови
Нормотермия 37°C	0,47±0,007	1,16±0,21	0,35±0,01	2,27±0,07
Гипотермия 30°C	0,85*±0,05	1,13±0,11	1,23*±0,30	2,65*±0,10
Гипотермия 30°C 3 часа	0,6±0,09	1,39±0,8	0,25*±0,022	1,24*±0,26
Гипотермия 20°C	1,0*±0,1	1,4±0,10	1,14*±0,06	2,2*±0,22
Гипотермия 20°C +даларгин	0,87±0,03	2,27**±0,15	1,23±0,08	2,41±0,09
Самосогревание с 20°C до 37°C	0,72*±0,073	1,96*±0,12	1,06*±0,064	2,5±0,16

Примечание: Результаты выражены в  $K_{in}$  /г /мин. Представлены средние значения ( $\pm m$ ) 6-7 опытов.

# АНТИОКСИДАНТЫ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Наиболее значительно увеличивается у гипотермических животных суммарная антиокислительная активность в сыворотке крови - на 67-71%, в наименьшей мере - в ткани печени.

Наши предыдущие исследования [3] показали, что умеренная гипотермия, особенно пролонгированная, значительно инициирует процессы перекисного окисления липидов. Видимо, усиление генерации свободных радикалов кислорода при сильном холодовом стрессе и вызванная им активизация пероксидации липидов превышает "емкость" антиоксидантной системы тканей.

Изменения при гипотермии активности водорастворимой фракции антиоксидантной системы (белки, пептиды, некоторые аминокислоты, тиоловые компоненты, аскорбиновая кислота и др.) неплохо коррелирует с изменением суммарной антиокислительной активности.

При охлаждении животных до 30°C наблюдается достоверное увеличение активности водорастворимой фракции антиоксидантной системы в мозге (на 80,8%), скелетной мышце (на 22,3%) и сыворотке крови (на 16,8%). Активность гидрофильных компонентов антиоксидантной системы в печени при этом не меняется. Высокий уровень активности водорастворимой фракции антиоксидантной системы сохраняется и при гипотермии 20°C. При пролонгировании в течение 3 часов умеренной гипотермии активность гидрофильных антиоксидантов в скелетной мышце и сыворотке крови снижается, по сравнению с кратковременной гипотермией, соответственно в 4,9 и 2,1 раза и устанавливается на более низком, чем в контроле уровне.

Поскольку суммарная антиокислительная активность в скелетной мышце и, особенно, в сыворотке крови при этом сохраняется на более высоком уровне, чем у интактных животных, можно предположить усиление при умеренной пролонгированной гипотермии роли гидрофобных составляющих антиоксидантной системы.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что при кратковременной гипотермии суммарная антиокислительная активность и активность гидрофильной фракции антиоксидантной системы поддерживаются на высоком уровне, превышая в большинстве тканей контрольные значения.

При определении активности ферментативных компонентов антиоксидантной системы - супероксиддисмутазы и каталазы в динамике гипотермии было обнаружено (табл. 3-4), что их изменения зачастую разнонаправлены и имеют органно-тканевые особенности.

Таблица 3. Активность каталазы в тканях крыс при гипотермии.

Вариант Опыта	Мозг	Гипотала мус	Печень	Почка	Миокард	Икроножная мышца	Сыворотка крови
Нормотер- мия 37°C	1,6±0,03	1,29±0,13	116,0±99,51	80,7±6,83	10,2±0,8	3,2±0,44	1,03±0,10
Гипотермия 30°C	1,4*±0,06	1,90*±0,15	128,8±13,2	76,9±6,92	13,3*±0,7	2,27±0,22	0,83±0,07
Гипотермия 30°C 3 часа	1,24*±0,17	1,56±0,26	95,1±9,42	67,4*±9,82	9,0±1,52	1,84*±0,24	0,97±0,18
Гипотермия 20°C	1,76*±0,06	2,27*±0,25	185,3*±12,1	93,7±7,14	14,0*±1,02	2,1±0,21	1,46±0,19
Гипотермия 20°C +даларгин	2,89±0,19	2,02±0,08	165,0±12,2	67,2**±8,87	8,42**±0,51	2,12±0,20	0,55**±0,0
Самосогре- вание с 20°C до 37°C	1,71±0,01	2,04*±0,11	139,7±7,38	104,0±10,1	10,1±0,41	1,19*±0,08	1,34±0,06

Примечание: Результаты выражены в мкмоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> /мин на 1 мг белка. В каждой серии было 6-7 опытов



Таблица 4. Активность супероксиддисмутазы в тканях крыс при гипотермии.

Вариант опыта	Мозг	Гипоталамус	Печень	Почка	Миокард	Икроножная мышца
Нормотермия 37°C	77,1±4,87	82,0±4,36	200,7±18,30	117,6±12,73	94,2±14,10	36,0±4,72
Гипотермия 30°C	73,2±14,45	104,5±11,55	148,1±15,90	64,6*±8,16	43,8*±4,75	18,5*±2,03
Гипотермия 30°C 3 часа	130,0*±16,87	185,1*±16,62	265,5±28,23	174,3*±17,32	62,8±12,63	61,5*±9,16
Гипотермия 20°C	35,4*±0,63	62,1±5,81	97,6*±13,2	32,9*±2,67	39,1*±3,16	19,3*±2,92
Гипотермия 20°C + даларгин	35,7±3,59	64,8±6,83	90,4±8,11	24,6±2,73	33,8±4,36	8,63**±1,18
Самосогревание с 20°C до 37°C	65,3±11,64	104,0*±7,64	104,9*±11,17	30,2*±2,90	42,0*±6,46	2,85*±0,29

Примечание: Результаты выражены в усл. ед/мг белка. В каждой серии было по 6-7 опытов

Направленность изменений каталазы в тканях гипотермических крыс в основном совпадает с направленностью изменений суммарной антиокислительной активности и активности водорастворимых антиоксидантов. Так, при кратковременной гипотермии, как умеренной, так и глубокой, активность этого фермента либо превышает контрольный уровень, либо равна ему. При пролонгировании умеренной гипотермии наблюдается достоверное понижение активности каталазы в больших полушариях мозга и скелетной мышце соответственно на 22% и 42,5%. Активность фермента в других органах при этом не меняется.

Изменение активности супероксиддисмутазы в динамике гипотермии существенно отличается от характера изменения других исследуемых компонентов антиоксидантной системы. Так, у охлажденных до 30°C животных, в состоянии ярко выраженного холодового стресса, активность фермента в тканях мозга и печени не подвергается достоверным изменениям, однако в других органах понижается примерно в 2 раза (табл. 4). Достоверное понижение активности супероксиддисмутазы в миокарде крыс, охлажденных до 30°C, отмечено в работе Шкестерс с сотр. [8].

Снижение активности супероксиддисмутазы в ряде органов обнаружено и при других формах стресса [2, 9, 10].

Существенно снижается активность супероксиддисмутазы (особенно Cu,Zn-супероксиддисмутазы) при гипоксии [11, 12], которая характерна для многих тканей в состоянии умеренной гипотермии [13].

Причиной понижения активности супероксиддисмутазы при достаточно сильных стрессорных воздействиях, по-видимому, являются конформационные изменения фермента.

При охлаждении крыс до 20°C в состоянии "холодового наркоза", сопровождающегося существенным снижением окислительных процессов [13], активность супероксиддисмутазы во всех исследованных тканях, исключая гипоталамус, устанавливается на уровне в 2-3 раза более низком, чем в контроле. В гипоталамусе наблюдается тенденция к снижению активности фермента, однако она статистически недостоверна.

Значительное понижение активности супероксиддисмутазы в тканях животных при глубокой гипотермии, видимо, является следствием уменьшения в этих условиях генерации супероксидного анион-радикала и других активных форм кислорода, образование которых в норме составляет около 5% от потребляемого кислорода [14].

При пролонгированном действии умеренной (30°C) гипотермии активность супероксиддисмутазы во всех органах повышается по сравнению с контролем в 1,4-3,3 раза (табл. 4). При этом активность фермента в больших полушариях мозга

и гипоталамусе в 1,7 и 2,2 раза, в скелетной мышце и почке соответственно в 3,3 и 2,7 раза превышает уровень контроля, а в печени и миокарде существенно не отличается от него.

Таким образом, пролонгирование действия умеренной гипотермии в течение 3-х часов способствует повышению активности супероксиддисмутазы, возможно за счет синтеза как индуцируемого фермента.

Несмотря на усиление активности супероксиддисмутазы, интенсивность перекисного окисления липидов на этом этапе гипотермии значительно превышает контрольный уровень [3]. Следовательно, процесс интенсификации пероксидации мембранных липидов, который был "запущен" при умеренной кратковременной гипотермии, нормализовать не удастся.

Внутрибрюшинное введение опиоидного пептида даларгина крысам, с последующим их охлаждением до 20°C, не приводило к активации антиоксидантной системы в большинстве изученных органов и тканей. Отсюда можно предположить, что отмеченное нами ранее [3] заметное понижение интенсивности процесса перекисного окисления липидов у гипотермических крыс, предварительно инъецированных даларгином, видимо, связано с его стабилизирующим действием на мембраны и снижением генерации свободных радикалов. Уменьшение генерации свободных радикалов кислорода даларгином отчасти может быть обусловлено, отмеченным в литературе антистрессорным эффектом этого пептида [2, 15, 16].

Стабилизирующее действие даларгина на мембраны подтверждается данными по изучению активности каталазы в сыворотке крови охлажденных до 20°C животных (табл. 3). Известно, что каталаза поступает в сыворотку в основном при повреждении эритроцитов [17]. Обнаруженное нами почти 3-х кратное понижение активности этого фермента у охлажденных до 20°C крыс с введенным даларгином, по сравнению с охлажденными до 20°C животными без его введения, достаточно убедительно свидетельствует о большей устойчивости эритроцитарной мембраны у животных, инъецированных даларгином.

Самосогревание крыс после глубокой гипотермии, сопровождающееся интенсификацией окислительных процессов [13] и активацией процессов перекисного окисления липидов [18, 19], не приводило, тем не менее, к заметному изменению суммарной антиокислительной активности и активации водорастворимой фракции антиоксидантной системы в большинстве изученных органов и тканей.

Изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы при этом были несколько более выражены. Так, при самосогревании достоверно увеличивается активность супероксиддисмутазы нервной ткани: на 142% в больших полушариях и на 67% в гипоталамусе. Активность фермента в гипоталамусе при этом превышает уровень не только гипотермических, но и интактных животных.

Высокий уровень активности супероксиддисмутазы в гипоталамусе при самосогревании, а также при кратковременной и пролонгированной умеренной гипотермии, видимо, обусловлен важной ролью гипоталамуса в терморегуляции и активной генерацией в эти периоды свободных радикалов кислорода.

Высокая активность супероксиддисмутазы (и каталазы) в гипоталамусе при указанных выше состояниях может в той или иной мере нейтрализовать негативные последствия супероксидного анион-радикала и пероксида водорода и способствовать нормальному функционированию этого образования мозга.

Из табл. 3-4 видно, что активность супероксиддисмутазы и каталазы в печени, почках, миокарде крыс при самосогревании после глубокой гипотермии не подвергается значительным изменениям. Это согласуется с данными Никитченко и соавт. [18], которые не обнаружили существенного изменения активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы и цитохром-Р450-пероксидазы в печени крыс при самосогревании после глубокой (20°C) гипотермии.

Вместе с тем наши эксперименты выявили весьма заметное снижение при самосогревании активности супероксиддисмутазы (на 85%) и каталазы (на 43%) в скелетных мышцах задних конечностей. По-видимому, это связано с тем, что в скелетных мышцах, в отличие от других изученных органов, преобладают анаэробные процессы. Мышцы задних конечностей не принимают заметного участия в мышечной дрожи, возникающей при самосогревании и на начальных этапах охлаждения. Низкий уровень кровообращения в скелетных мышцах при самосогревании сопровождается развитием умеренной гипоксии [13], при которой активность супероксиддисмутазы в органах и образование супероксидного анион-радикала снижаются [11, 12].

Таким образом, результаты экспериментов показывают, что активность изученных компонентов, исключая супероксиддисмутазу, в тканях в динамике гипотермии и при самосогревании эндотермного организма поддерживается на довольно высоком уровне. Это сдерживает активизацию процессов перекисного окисления липидов и препятствует развитию необратимых нарушений в физико-химических свойствах мембран.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б.* (1993). Успехи совр. биол., №3, 286-296.
2. *Меерсон Ф.З., Пиенникова М.Г.* (1988). Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. М.: Наука.
3. *Львова С.П., Горбунова Т.Ф., Абаева Е.М.* (1993). Вопр. мед. химии, №3, 21-24.
4. *Промыслов М.Ш., Демчук М.Л.* (1990). Вопр. мед. химии. №4, 91-92.
5. *Семенов В.Л., Ярош А.Р.* (1985). Укр. биохим. журн., №3, 50-52.
6. *Королюк М.А., Иванова Л.Н., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* (1988). Лаб. дело. №1, 16-19.
7. *Fried R.* (1975) Biochem., №5, 557-660.
8. *Шкестерс А.П., Утно Л.Я., Гингерсоне М.Я.* (1991). Бюлл. эксперим. биол. и мед., №6, 593-595.
9. *Микаелян Э.М.* (1988). Сб. "Перекисное окисление липидов в норме и патогенезе различных заболеваний". Ереван, с. 93-99.
10. *Рихарева Г.Т., Маклецова М.Г., Менджерицкий А.М. и др.* (1993). Известия АН. Серия биологическая, №2, 243-255.
11. *Биленко М.В.* (1989). Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина.
12. *Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф.* (1989). Укр. биохим. журн., №2, 14-27.
13. *Эмирбеков Э.З., Львова С.П.* (1985). Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. Ростов/Дон: изд. РГУ.
14. *Byezkovski I.Z., Gesner T.* (1988). Int. Biochem., №6, 569-580.
15. *Лишманов Ю.Б., Травков Ю.А., Федотов Т.В., Реброва Т.Ю.* (1991). Бюлл. эксперим. биол. и мед., №6, 619-621.
16. *Хайсман Е.Б., Арефолов В.А., Маликова А.А.* (1988). Бюлл. эксперим. биол. и мед., №3, 302-305.
17. *Дубинина Е.Е.* (1992). Укр. биох. журн., №2, 3-15.
18. *Никитченко Ю.В., Овсянников С.Е., Мазалов В.К., Литина О.В.* (1989). Сб. "Патофизиологические аспекты действия холода на организм". Харьков: изд. института проблем криобиологии и криомедицины Украины, с. 98-101.
19. *Эмирбеков Э.З., Львова С.П., Мусаев Б.С. и др.* (1991). Сб. "Биохимические механизмы холодовой адаптации". Харьков: изд. института проблем криобиологии и криомедицины Украины, с. 158-165.

Поступила 23.05.00



**ANTIOXIDATIVE SYSTEM OF RAT TISSUES IN HYPOTHERMIA  
AND DALARGIN INJECTION**

*S.P. Lvova, E.M. Abaeva, A.G. Gasangadzhiyeva, I.K. Mikhaylenko*

Research Institute of Biology, Dagestan State University, Dagestan, Makhachkala, 367025, ul.  
M.Gadzhieva 43a, tel.(8722)682326, tel./fax (8722)682326, 682332, e-mail: root@eldaggu.dagestan.su

Total antioxidative activity, activity of water soluble fraction of antioxidative system, superoxide dismutase and catalase activities in brain, liver, myocard, skeletal muscle, kidney and serum at hypothermia 30°C, 20°C and self-warming from 20°C to 37°C were studied. Activity of antioxidative system is sustained at high level, except superoxide dismutase. The latter is activated significantly at 30°C hypothermia prolonged up to 3 h. Dalargin injection 30 min before onset of cooling stabilizes the erythrocyte membrane without enhancement of antioxidative activity in majority of investigated tissues.

**Key words:** hypothermia, dalargin, superoxide dismutase, catalase, non-enzymatic antioxidants.