

## Влияние экстремальных криовоздействий на свободнорадикальное окисление липидов сыворотки крови

В.Л. КОЦАРЬ, В.Г. БАБИЙЧУК, А.В. ГАЕВОЙ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

В настоящее время проводятся глубокие фундаментальные исследования действия экстремально низких температур ( $-110^{\circ}\text{C}$  –  $-160^{\circ}\text{C}$ ) на организм животных и человека с целью обоснования применения метода в комплексе лечения ряда заболеваний [1]. Это связано с тем, что до настоящего времени в мировой литературе отсутствуют данные по глубокому анализу реакции различных функциональных систем организма в ответ на кратковременное действие экстремально низких температур.

Есть основание полагать, что реакции организма на воздействие экстремально низких температур будут осуществляться по механизмам общего адаптационного синдрома и развиваться в самые ранние сроки. Считается, что нарушение структуры и функции мембран, лежащих в основе жизнедеятельности клетки, замедление или ускорение процессов старения организма связаны с изменением процессов свободно радикального окисления липидов [1, 3, 6]. Вызывает интерес, как будут влиять экстремально низкие температуры на стареющий организм как модель свободно-радикальной патологии и снижения резервных и адаптационных возможностей [4]. Проведенные нами экспериментальные исследования, касающиеся изучения влияния экстремально низких температур на процессы свободнорадикального окисления (СРО) в сыворотке крови животных различных возрастных групп позволили расширить наши представления о первичных реакциях организма на экстремальные криовоздействия (ЭКВ).

Одним из перспективных методов, дающих объективную информацию о состоянии в организме двух взаимосвязанных процессов свободно-радикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) и образования активных форм кислорода, является хемилюминесценция биологического материала (ХЛ) [2, 3, 5, 7]. Регистрация хемилюминесценции, свечения, возникающего при взаимодействии свободных радикалов [3, 5], позволяет получить объективную картину СРО, при метаболических сдвигах любой этиологии и широко используется в биологии и медицине [2, 5, 8].

*Адрес для корреспонденции:* Коцарь В.Л., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Целью работы явилось изучение особенностей влияния экстремальных криовоздействий на параметры индуцированной перекисью водорода хемилюминесценции сыворотки крови у животных различных возрастных групп.

### Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии Вистар двух возрастных групп. В первой группе – половозрелые животные (возраст 6 месяцев), вторая – пожилые (возраст 2-2,5 года). Эксперименты проведены в соответствии с Общими принципами экспериментов на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985). Экспериментальные криовоздействия осуществляли в криокамере с температурой воздушной среды  $-120^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5 минут, ректальную температуру тела животных контролировали температурным датчиком, она оставалась постоянной в ходе сеансов криовоздействия. Каждая возрастная группа животных была разбита на четыре подгруппы (по шесть животных в каждой подгруппе): первая – интактные животные, вторая – крысы, которые получили три сеанса экстремальных криовоздействий (ЭКВ), третья – шесть ЭКВ, а четвертая – девять. Исследования параметров ХЛ проводили через сутки после сеансов ЭКВ. Измерение параметров ХЛ осуществляли на хемилюминометре ХЛМЦ-01М в термостатируемых кюветах при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  по методике [7] в течение 180 секунд. Для описания экспериментальных кривых использовали параметры ХЛ: светосумма ХЛ за 180 секунд  $S(180)$ , амплитуда первой вспышки  $I_{\text{max}1}$ , амплитуда второй вспышки  $I_{\text{max}2}$ , П80-остаточная интенсивность (интенсивность ХЛ на 180-й секунде), время достижения второго максимума  $T$ .

Статистическую обработку результатов проводили с помощью методов вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента, оценивая вероятность полученных результатов на уровне значимости не менее 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

При анализе кинетических кривых ХЛ, инициированной  $H_2O_2$ , в сыворотке крови крыс обнаружено, что у взрослых и пожилых животных они аналогичны данным литературы [6, 7], после введения в среду  $H_2O_2$  характеризуются двумя максимумами вспышек ХЛ, разделенных во времени (рис. 1). Время наступления второго максимума в сыворотке взрослых крыс  $T=75$  сек, а в сыворотке пожилых  $T=20-35$  сек (таблица). Согласно литературным данным [4, 7], во время второй вспышки ХЛ происходит накопление пероксидов липидов, которые принято считать первичными продуктами СРО липидов, и вторая вспышка ответственна за инициированное введением  $H_2O_2$ , окисление липидов сыворотки крови, а время достижения второго максимума  $T$  прямо пропорционально концентрации антиоксидантов в исследуемой пробе [8]. Исходя из этого, можно отметить, что в сыворотке интактных пожилых животных количество антиоксидантов снижено по отношению к таковым интактной группы взрослых крыс, что не противоречит данным литературы [4].

При анализе влияния низкотемпературных воздействий установлено, что 3-кратное ЭКВ в группе взрослых животных проявляют прооксидантное действие, так как  $I_{max2}$  принимает наибольшее значение, а если учесть, что время достижения второго максимума в исследуемой пробе  $T$  такое же, как и в контрольной группе, то можно предположить, что интенсификация СРО липидов сыворотки крови у взрослых животных после 3-кратного ЭКВ осуществляется за счет накопления пероксидов липидов, существенно не затрагивая антиоксидантных резервов, но, возможно, уменьшая их активность [9]. После 6-кратного ЭКВ  $I_{max2}$  уменьшается по сравнению с 3-кратным ЭКВ, а параметр  $T$  остается неизменным, поэтому предполагаем, что 6-кратное ЭКВ у взрослых животных включает механизмы активации антиоксидантной системы, не затрагивая ее количественную сторону. У кинетической кривой ХЛ сыворотки крови взрослых крыс после 9-кратного ЭКВ второй максимум выражен нечетко, но аппроксимируя механизмы влияния 3-кратного и 6-кратного ЭКВ на антиоксидантную систему и тенденции изменения формы кривой при увеличении кратности ЭКВ, а также, учитывая, что  $I_{180}$  (остаточная интенсивность), которую связывают с резервной емкостью

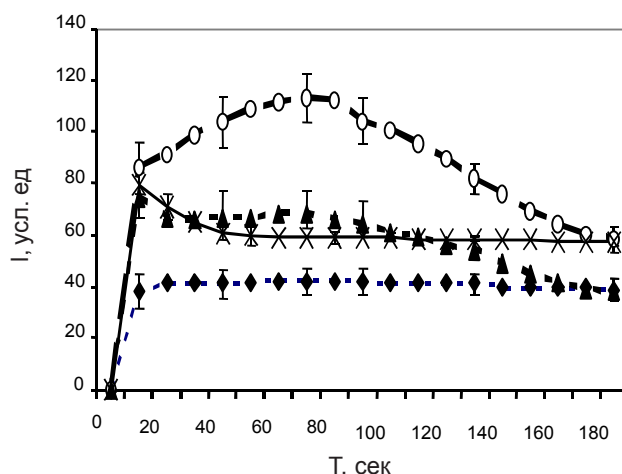


Рис. 1. Кинетические кривые индуцированной  $H_2O_2$  хемилуминесценции сыворотки крови взрослых крыс после экстремальных кривоздействий:  $\blacklozenge$  – контроль;  $\circ$  – 3 ЭКВ;  $\blacktriangle$  – 6 ЭКВ;  $\times$  – 9 ЭКВ.

антиоксидантной системы [7], принимает наибольшее значение, возникает предположение, что 9-кратное ЭКВ не только интенсифицирует активность антиоксидантов, но и увеличивает их количество.

Для кинетических кривых ХЛ сыворотки крови пожилых крыс (рис. 2) прослеживаются иные закономерности влияния ЭКВ на параметры ХЛ. В связи с тем, что второй максимум интенсивности  $I_{max2}$  наступает через короткое время после первого и выражен нечетко, то по этому параметру сложно судить о состоянии антиоксидантной системы, однако можно отметить, что параметр  $T$  после 3-кратного ЭКВ незначительно уменьшается, предположительно из-за уменьшения количества антиоксидантов, а 6-кратные и 9-кратные ЭКВ увеличивают  $T$  относительно нормы и 3-кратного ЭКВ, отображая увеличение антиоксидантной емкости сыворотки крови. Отмечено, что величина параметра  $I_{max2}$  после низкотемпературных воздействий у пожилых крыс уменьшается недостоверно.

Параметры СРО сыворотки крови крыс различных возрастных групп после ЭКВ

Группы животных	Воздействие	Параметры ХЛ				
		$S_{180}$ , имп./сек.	$I_{max1}$ , усл. ед.	$I_{max2}$ , усл. ед.	$I_{180}$ , усл. ед.	$T$ , сек
Взрослые	Контроль	30132±7974	38±2,3	42±2,9	39±1,6	75
	3 ЭКВ	58788±3094	86±5,5	113±8,6	58±2,1	75
	6 ЭКВ	41507±2175	74±3,5	68±6,1	38±1,1	75
	9 ЭКВ	39179±2175	79±4,7	65,1±4,2	59±0,8	75
Пожилые	Контроль	29871±2094	78±4,2	79±3,7	20±0,6	25
	3 ЭКВ	28886±1259	66±6,4	64±4,5	24±0,5	20
	6 ЭКВ	21321±736	51±2,1	60,3±5,1	20±0,7	35
	9 ЭКВ	26343±1495	47±1,6	57,2±2,3	19±0,3	35

Как известно, величина светосуммы ХЛ S180 пропорциональна общей активности свободно-радикальных процессов, а интенсивность первой вспышки ХЛ сыворотки крови  $I_{\max 1}$ , возникающей при введении в реакционную среду  $H_2O_2$ , обусловлена разложением перекиси ионами железа по реакции аналогичной реакции Фентона и пропорциональна их количеству [4]. Из результатов, представленных в таблице, видно, что параметр S180 у взрослых и пожилых животных интактных групп достоверно не отличается. ЭКВ по-разному влияют на этот параметр в группах взрослых и пожилых крыс. У взрослых 3-кратное ЭКВ ведет к резкому увеличению этого параметра, который снижается с увеличением кратности воздействия, оставаясь достоверно выше, чем в контроле, а у пожилых каждое ЭКВ снижает пропорционально кратности воздействия S180 относительно контрольных значений. Кинетический параметр  $I_{\max 1}$  ведет себя подобным образом, если учесть, что он зависит от изменения концентрации ионов железа в исследуемом образце, то по характеру его изменения будет справедливо утверждать, что ЭКВ увеличивают концентрацию железа в сыворотке крови взрослых крыс, а в группе пожилых уменьшают. Исследуя параметр I180, оценивающий остаточную антиоксидантную емкость, отмечено, что в сыворотке интактных взрослых животных он выше, чем у пожилых, и увеличивается после ЭКВ, в сыворотке пожилых крыс параметр I180 не изменяется.

### Выводы

Таким образом, кинетические параметры ХЛ позволяют сделать экспресс оценку состояния СРО липидов сыворотки крови после воздействия любого происхождения, предположить механизмы их влияния на СРО, определиться с дальнейшими методами исследований.

Анализ кинетических параметров ХЛ показывает, что ЭКВ оказывают различное влияние на СРО липидов сыворотки крови взрослых и пожилых крыс.

В сыворотке взрослых животных изменение кинетических параметров более выражено, чем у пожилых, и зависит от кратности воздействия, 3-кратное ЭКВ активизирует СРО липидов сыворотки крови, снижая активность антиоксидантной системы и увеличивая концентрацию ионов железа, после 6-кратного и 9-кратного ЭКВ наблюдается снижение параметров ХЛ, вследствие изменения активности антиоксидантной системы.

У пожилых животных изученные ЭКВ незначительно уменьшают суммарную интенсивность процессов СРО сыворотки крови и меньше, чем у

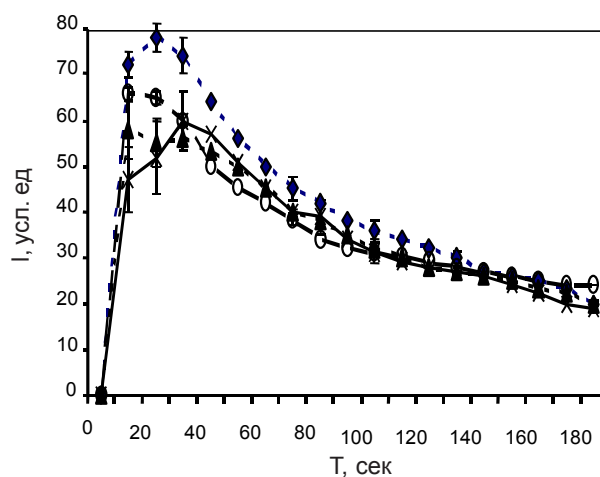


Рис. 2. Кинетические кривые  $H_2O_2$  индуцированной ХЛ сыворотки крови пожилых крыс после экстремальных криовоздействий: ◆ – контроль; ○ – 3 ЭКВ; ▲ – 6 ЭКВ; × – 9 ЭКВ.

взрослых животных, влияют на изучаемые параметры.

Учитывая, что старение можно представить, как модель свободнорадикальной патологии, можно утверждать, что механизмы действия экстремально низких температур зависят от изначального свободнорадикального статуса.

### Литература

1. Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Бабийчук Г.А. и др. Структурно-функциональные механизмы действия экстремального охлаждения на терморегуляторные центры гипоталамуса // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 62-70.
2. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток животных // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер.: Биофизика.– 1989.– Т. 24.– С. 45-60.
3. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов.– М.: Высшая школа, 1989.– 183 с.
4. Дудник Л.Б. Интенсификация перекисного окисления липидов и его роль в изменении физико-химических свойств структурной организации мембран при ишемии печени: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– М., 1981.– 21 с.
5. Кузьменко А.И. Характеристика  $H_2O_2$  инициированного окисления липидов сыворотки крови по кинетическим параметрам хемилюминесценции // Укр. біохім журн.– 1999.– Т. 71, №4.– С. 63-66.
6. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Шергин С.Н. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты.– Новосибирск, 1994.– 250 с.
7. Серкиз Я.И., Дружин Н.А., Хриенко А.П. и др. Хемилюминесценция крови при радиационном воздействии.– Киев: Наук. думка, 1989.– 176 с.
8. Фартхутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Свободнорадикальные методы исследований в биологии и медицине.– Уфа, 1998.– 167 с.