10. *Синельник О. Д., Чайковська Л. А.* Вплив етакринової кислоти на жовчовіддільну функцію печінки // XI з'їзд Укр. фізіол. т-ва, Дніпропетровськ, вересень, 1982: Тези доп. — Київ : Наук. думка, 1983. — С. 373.
11. *Яременко М. С., Харламова О. Д.* HCO_3^--АТФаза клеток эпителия желчного пузыря кролика // Физиол. журн. — 1978.—**24**, № 1. — С. 67—71.
12. *Aschworth C. T., Zuebel F. I., Steward S. C.* The fine structure localization of adenosine triphosphatase in the small intestine, kidney and liver of the rat // J. Cell. Biol. — 1963.—**17**, N 1. — P. 1—18.
13. *Fanestil D. D., Hastings A. B., Mahowald T. A.* Environmental CO_2 stimulation of mitochondrial adenosine triphosphatase activity // J. Biol. Chem. — 1963.—**238**, N 10.— P. 836—843.
14. *Fiske C. H., Subbarow Y.* The colorimetric determination of phosphorus // Ibid. — 1925.—**66**, N 1. — P. 375—400.
15. *Iritani N., Wells W. W.* Studies on a HCO_3-stimulated ATPase and carbonic anhydrase system in rat liver lisosomes // Arch. Biochem. — 1974.—**164**, N 2. — P. 357—366.
16. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.* Protein measurement with the Folin Phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951.—**193**, N 2. — P. 265—275.
17. *Todo G., Oka H., Oda T., Ikeda Y.* Subfractionation of rat liver plasma membrane. Uneven distribution of plasma membrane bound enzymes on the liver cell surface // Biochim. et biophys. acta. — 1975.—**413**, N 1. — P. 52—54.
18. *Van Rossum G. D. V.* On the coupling of respiration to cation transport in slice of rat liver // Ibid. — 1970.—**205**, N 1. — P. 7—17.
19. *Whittembury G., Fishman I.* Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused to ard kidney: the effect of K, oubain and ehacrinic acid // Pflügers. Arch. — 1969.—**307**, N 2. — S. 138—153.

Ин-т физиологии Киев. ун-та
им. Т. Г. Шевченко МВССО УССР

Поступила 19.11.85

УДК 612.014

В. Г. Селятицкая, Н. Г. Колосова, И. А. Герлиц, В. Ю. Куликов, Ю. П. Шорин

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РЕАКЦИЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ИЗМЕНЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЕЧЕНИ КРЫС К ГЛЮКОКОРТИКОИДАМ ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), выступая в качестве активных модификаторов физико-химических свойств биологических мембран [2], могут играть значительную роль в изменении чувствительности тканей к регуляторным воздействиям, в частности гормональным.

При адаптации к действию низких температур у животных усиливается метаболизм [8], увеличивается синтез и секреция адаптивных гормонов [14], изменяется чувствительность тканей к гормонам: повышается к норадреналину [15] и снижается к инсулину [10]. Можно предполагать, что изменение чувствительности периферических тканей к действию гормонов — один из механизмов, лежащих в основе адаптивных перестроек метаболизма [10]. В определенной мере чувствительность связана с состоянием липидов мембран. Ранее мы показали, что при адаптации к холоду изменяются реакции ПОЛ и контролирующих их систем в печени и легких экспериментальных животных [5].

Цель настоящей работы — исследование возможной роли указанных выше изменений в модификации чувствительности клеток печени адаптированных к холоду животных к глюкокортикоидным гормонам.

Методика

Работу проводили на 120 крысах-самцах линии Вистар, полученных из питомника АМН СССР «Столбовая», массой 200—250 г. Во время адаптации к холоду животных содержали при температуре +4, +5 °С в течение 7 нед (одна экспериментальная группа). Животных остальных экспериментальных групп, а также контрольной группы со-

держали при +22 °С. В первой серии экспериментов контрольным и адаптированным к холоду животным вводили 10 мкг дексаметазона (ДМ) на 100 г массы тела внутрибрюшинно за 30 мин, 2, 3 и 5 ч до забоя. Животных декапитировали, в печени определяли содержание гликогена [16], активность тирозинаминотрансферазы (ТАТ; КФ 2.6.1.5) [12], антиокислительную активность липидов (АОА) [2], содержание малонового диальдегида (МДА) и скорость его наработки во время аскорбатзависимого переокисления (АЗП) липидов [17].

Во второй серии экспериментов для моделирования разнонаправленных изменений интенсивности процессов ПОЛ в организме животным в качестве антиоксиданта вводили ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол), 12 мг на 100 г массы [2] в 5 %-ном твине-85, а в качестве прооксиданта — линетол (0,2 мл на 100 г массы) [1] в 5 %-ном твине-85. Контрольным крысам вводили 5 %-ный твин-85 в физиологическом растворе. Твин-85 использовали как детергент для солюбилизации ионола, все вещества вводили внутрибрюшинно. Через 14 ч части животных вводили ДМ (10 мкг на 100 г массы) и еще через 5 ч всех животных забивали. В печени животных этой серии экспериментов определяли показатели, аналогичные определяемым в первой.

Результаты и их обсуждение

ТАТ — один из наиболее изученных ферментов в печени животных. Индукция этого фермента при введении различных гормонов детально исследована. Показано, что после введения глюкокортикоидов активность ТАТ в печени крыс достигает максимальных значений через 5—6 ч [7].

Как видно из табл. 1, у контрольных животных активность ТАТ в печени через 5 ч после введения ДМ повышается в 6 раз, в то время как у опытных крыс она увеличивается в 4 раза, причем этот уровень активности отмечен уже через 3 ч после инъекции гормона. Базальная активность ТАТ в печени адаптированных к холоду животных достоверно выше, чем в контроле (см. табл. 1).

Хорошо известен эффект глюкокортикоидов — повышение запасов гликогена в печени [11]. При исследовании его содержания показано, что в печени адаптированных к холоду животных базальный уровень содержания гликогена ниже, чем контрольных. После введения ДМ его содержание повышается, достигая максимального значения, как и при индукции ТАТ, через 3 ч после введения гормона (см. табл. 1). Результаты позволяют предполагать, что метаболическая реакция печени адаптированных к холоду животных реализуется в более ранний период после введения гормона. Известно, что ТАТ участвует в переводе аминокислоты тирозина в процесс глюконеогенеза [7]. Повышенный базальный уровень активности этого фермента и снижение содержания гликогена в печени позволяют предположить, что при действии холода, как и при голодании, возрастает функция печени, связанная с выбросом глюкозы в кровь.

Изучение реакций ПОЛ в печени показало, что у контрольных животных после введения ДМ снижается АОА липидов, повышается содержание МДА, причем сдвиги эти достигают достоверных значений через 5 ч после введения гормона (см. табл. 1). Скорость АЗП достоверно возрастает уже через 30 мин после введения ДМ, затем она начинает убывать, достигая через 3 ч контрольных значений и вновь возрастает через 5 ч.

В отличие от беспородных крыс, у которых адаптация к холоду приводит к повышению АОА липидов печени [5], у крыс линии Вистар отмечены не отличающиеся от контрольных или даже более низкие значения этого показателя при длительном воздействии холода [6]. В настоящем эксперименте у адаптированных к холоду крыс стабилизация содержания продуктов ПОЛ на более низком, чем у контрольных животных, уровне при неизменной скорости АЗП липидов произошла на фоне сниженной АОА (см. табл. 1). Уже через 30 мин после введения ДМ опытным животным АОА липидов еще больше уменьшается, при этом возрастают содержание МДА и скорость АЗП липидов в печени.

Таблица 1. Активность ТАТ, содержание гликогена и показатели активности реакций ПОЛ в печени контрольных и адаптированных к холоду крыс в разные сроки после введения ДМ

Показатель	Время, прошедшее после введения ДМ животным				
	контрольным				
	00 мин	30 мин	2 ч	3 ч	5 ч
Активность ТАТ, мкмоль·ч$^{-1}$·мг$^{-1}$ белка	0,82±0,03	0,96±0,06	2,13±0,31	2,74±0,26	5,01±0,39
Содержание гликогена, г/100 г печени	5,3±0,56	4,45±0,84	4,53±1,05	4,63±0,79	7,25±0,15
АОА, ч/г липидов	324±18	318±20	245±13	264±18	213±14
Содержание МДА, нмоль/г печени	24,6±1,2	26,5±1,5	25,2±0,7	23,8±1,6	33,7±1,9
Скорость АЗП, нмоль МДА·мин$^{-1}$×г$^{-1}$ печени	3,1±0,2	4,9±0,3	4,2±0,3	3,1±0,3	4,0±0,3
Показатель	Время, прошедшее после введения ДМ животным				
	адаптированным к холоду				
	00 мин	30 мин	2 ч	3 ч	5 ч
Активность ТАТ, мкмоль·ч$^{-1}$·мг$^{-1}$ белка	1,02±0,05	1,12±0,12	2,19±0,21	4,36±0,61	4,52±0,19
Содержание гликогена, г/100 г печени	2,53±0,18	3,37±0,63	2,83±0,66	4,53±0,78	4,11±0,35
АОА, ч/г липидов	240±14	167±10	370±26	330±17	244±13
Содержание МДА, нмоль/г печени	17,6±0,8	21,9±2,0	25,0±1,1	23,2±1,2	43,1±6,4
Скорость АЗП, нмоль МДА·мин$^{-1}$×г$^{-1}$ печени	2,7±0,2	3,9±0,2	4,9±0,1	3,8±0,3	5,3±0,4

Примечание. Отличия большинства значений сравниваемых показателей внутри группы и между группами достоверны.

Через 2 ч содержание МДА и скорость АЗП продолжают повышаться, но начинает расти и АОА липидов, вероятно, в связи с мобилизацией антиоксидантов и как компенсаторный процесс, предупреждающий чрезмерную активацию ПОЛ. Через 3 ч общая картина сохраняется, хотя все изменения выражены меньше. Через 5 ч АОА липидов возвращается к исходным значениям, а содержание продуктов ПОЛ и скорость АЗП вновь возрастают. Следует отметить, что изменения процессов ПОЛ, наблюдаемые в печени контрольных животных только через 2—5 ч после введения ДМ, в печени адаптированных к холоду крыс наблюдаются уже через 30 мин после введения гормона (снижение АОА липидов и повышение содержания МДА).

Для того чтобы убедиться в правильности наших предположений о связи различий индукции ТАТ с особенностями реакций ПОЛ, проведена вторая серия экспериментов, в которых моделировали различные уровни активности ПОЛ путем введения животным про- и антиоксидантов. Введение антиоксиданта ионола приводит к значительному повышению АОА липидов, снижению содержания МДА и скорости АЗП липидов в печени (табл. 2). На фоне резкого ингибирования реакций ПОЛ существенно снижена базальная активность ТАТ. Введение этим животным ДМ приводит к значительному подъему уровня МДА и скорости АЗП липидов, при этом резко возрастает индукция фермента — после введения ДМ его активность увеличивается в 14 раз. Введение линетола достоверно повышает скорость АЗП в печени и на этом фоне более чем в 2 раза повышена базальная активность ТАТ. Введение ДМ

этим животным приводит к уменьшению скорости АЗП, хотя она и остается выше, чем у контрольных, а активность ТАТ увеличивается только в 3 раза.

Таким образом, изменения физико-химических характеристик липидов, показателями которых в наших опытах служат АОА липидов, содержание продуктов ПОЛ и скорость их наработки во время АЗП липидов, могут выступать в качестве одной из причин изменения базальной активности и гормональной индукции ТАТ и, вероятно, интенсивности других глюкокортикоидзависимых процессов, о чем свидетельствуют данные определения содержания гликогена в печени адаптированных к холоду животных после введения ДМ.

Таблица 2. Активность ТАТ и показатели активности реакций ПОЛ в печени контрольных и подвергнутых воздействию ионола и линетола крыс после введения ДМ

Показатель	5 %-ный твин		Ионол в 5 %-ном твине		Линетол в 5 %-ном твине	
	До введения ДМ	После введения ДМ	До введения ДМ	После введения ДМ	До введения ДМ	После введения ДМ
Активность ТАТ, мкмоль·$ч^{-1}$·$мг^{-1}$ белка	0,75±0,09	4,75±0,29	0,45±0,01	6,46±0,74	2,09±0,17	6,51±0,93
АОА, ч/г липидов	320±43	220±23	562±62	701±84	248±30	190±17
Содержание МДА, нмоль/г печени	24,2±1,3	26,6±1,8	16,8±0,4	23,9±1,6	27,6±1,8	31,7±1,8
Скорость АЗП, нмоль МДА·$мин^{-1}$·$г^{-1}$ печени	2,9±0,2	3,8±0,1	1,8±0,1	4,8±0,3	4,7±0,2	3,7±0,2

Примечание. Отличия большинства значений сравниваемых показателей внутри группы и между группами достоверны.

Поскольку ТАТ локализована преимущественно в растворимой фракции клетки, наблюдаемые сдвиги активности и индукции фермента нельзя отнести за счет конформационных изменений, как это показано, например, для мембранносвязанных ферментов при изменении липидного окружения: глюкозо-6-фосфатазы в микросомальной фракции [3] и аденилатциклазы в плазматических мембранах [13]. Считают, что повышение интенсивности реакций ПОЛ сопровождается усилением общей метаболической активности клетки [4, 9].

Вероятно, неспецифическая активация реакций ПОЛ, приводящая к усилению метаболизма, — одно из промежуточных звеньев механизма действия глюкокортикоидных гормонов на клетки. Следовательно, изменение реактивности системы ПОЛ при адаптации животных к холоду способно модулировать выраженность гормональнозависимых процессов.

V. G. Selyatitskaya, N. G. Kolosova, I. A. Gerlitz,
V. Yu. Kulikov, Yu. P. Shorin

LIPID PEROXIDATION ROLE IN THE RAT LIVER SENSITIVITY TO GLUCOCORTICOIDS UNDER CONDITIONS OF COLD ADAPTATION

A dexamethasone-induced increase of the tyrosine aminotransferase (TAT) activity and growth of the liver glycogen content in cold-adapted rats is less pronounced but takes place earlier than in control animals. Lipid peroxidation changes are observed in the liver of control rats 2-5 hours after dexamethasone injection but in the liver of cold-adapted rats — already after 30 minutes.

The study of TAT induction under different activity of lipid peroxidation, modulated by injection of ionol as antioxidant and linetol as prooxidant has shown that variations in physicochemical properties of lipids can serve as one of the reasons of changes in TAT original activity and hormonal induction. The nonspecific activation of lipid peroxidation as metabolism intensification factor is supposed to be one of the intermediates in the mechanism of glucocorticoid hormone action. Consequently, changes in lipid peroxidation reactivity during cold adaptation are able to modulate the expression of hormone-dependent processes.

Institute of Clinical and Experimental Medicine,
Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the
USSR, Novosibirsk

1. *Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Мхитарян В. Г.* Сдвиги в содержании витамина Е в тканях печени и мозга под влиянием непредельных жирных кислот // Биол. журн. Армении. — 1974.—**27**, № 12. — С. 83—87.
2. *Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др.* Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. — М. : Наука, 1975.—211 с.
3. *Дятловицкая Э. В., Леменовская А. Ф., Ваядниеце А. Т. и др.* Новый способ введения лизофосфолипидов в состав биологических мембран. Влияние лизофосфатидилхолина на активность мембраносвязанных ферментов // Биохимия. — 1980.—**45**, вып. 11. — С. 2036—2043.
4. *Козлов Ю. П.* Структурно-функциональные аспекты перекисного окисления липидов в биологических мембранах // Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. — М. : Наука, 1977. — С. 80—92.
5. *Колосова Н. Г., Шорин Ю. П., Куликов В. Ю.* Реакции перекисного окисления липидов в печени и легких крыс при долговременной адаптации к холоду // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1981.—**91**, № 4. — С. 436—437.
6. *Колосова Н. Г., Шорин Ю. П., Селятицкая В. Г. и др.* Перекисное окисление липидов и особенности эндокринной регуляции при адаптации крыс к холоду // Физиологические проблемы адаптации: Тез. IV Всесоюз. симпоз. по физиол. пробл. адаптации (Таллин 22—24 мая 1984 г.). — Тарту, 1984. — С. 68—69.
7. *Протасова Т. Н.* Гормональная регуляция активности ферментов. — М. : Медицина, 1975.—239 с.
8. *Хаскин В. В.* Энергетика теплообразования и адаптация к холоду. — Новосибирск : Наука. Сиб. отд-ние, 1975.—200 с.
9. *Храпова Н. Г.* Перекисное окисление липидов и системы, регулирующие его интенсивность // Структура, биосинтез и превращения липидов в организме животных и человека. — Л. : Наука, 1978. — С. 85.
10. *Шорин Ю. П., Селятицкая В. Г., Папафилова О. В. и др.* Адаптивные перестройки и гормональные механизмы их регуляции при акклиматизации к условиям Заполярья// Современные проблемы общей патологии в аспекте адаптации. — Новосибирск, 1980. — С. 4—12.
11. *Baxter J. D., Forsham P. H.* Tissue effects of glucocorticoids // Amer. J. Med.— 1972.— **53**, N 5. — P. 573—589.
12. *Diamondstone T. Y.* Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenilpyruvate to p-hydroxybensaldehyde // Anal. Biochem. — 1966.—**16**, N 3. — P. 395—401.
13. *Engelhard V. N., Glaser M., Storm D. R.* Effect of membrane phospholipid compositional changes on adenylate cyclase in LM cells // Biochemistry. — 1978.—**17**, N 16. — P. 3191—3200.
14. *Gale C. C.* Endocrine and metabolic responses to cold in baboons // Federat. Proc. — 1975.—**34**, N 8. — P. 1685—1691.
15. *LeBlank J.* Stress and interstress adaptation // Federat. Proc. — 1969.—**28**, N 3. — P. 996—1000.
16. *Seifter S., Dayton S., Novic B. et al.* The estimation of glycogen with the antrone reagent // Arch. Biochem. — 1950.—**25**, N 2. — P. 191—200.
17. *Wills E. D.* Effects of irradiation on subcellular components. 1. Lipid peroxide formation in the endoplasmatic reticulum // Intern. J. Radiation Biol. — 1970.—**17**, N 2. — P. 217—222.

Ин-т клин. и эксперим. медицины
Сиб. отд-ния АМН СССР, Новосибирск

Поступила 29.07.85