

УДК 616 433-008. 6-02: 612. 273. 2]-092. 9-07
© Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ МЕССЕНДЖЕРНЫХ СИСТЕМ ПРИ БАРОКАМЕРНОЙ ГИПОКСИИ

А.А. Вишневский, В.М. Яковлев, З.И. Хабибуллова

Институт физиологии и экспериментальной патологии высокогорья
Национальной академии наук Кыргызской Республики, 720048, Кыргызская
Республика, г. Бишкек, ул. Горького 1/5; тел.: 239352.

В полушариях мозга крыс определяли динамический баланс активностей двух основных систем вторичных мессенджеров: фосфоинозитидной и аденилатциклазной при 24-х часовом воздействии высотной гипоксии в барокамере (6000 м над ур. моря). Предварительно, в течение 8 дней, проводили угнетение обеих мессенджерных систем путем инъекций хлористого лития (прерывающим метаболизм инозитольных липидов) и пропранолола (блокатора аденилатциклазной системы). Для оценки последствий блокады и высотной гипоксии животных тестировали на физическую работоспособность и ориентировочную активность. Отмечено ухудшение этих физиологических показателей, вызванное как изолированным действием гипоксии, так и ее сочетанием с блокаторами, более выраженное во втором случае. Угнетение одной из мессенджерных систем специфическим блокатором не оказывало существенного ингибирующего влияния на другую. Показан синергичный характер взаимодействия: активация обеих систем в заданных условиях.

Ключевые слова: фосфоинозитидный ответ, cAMP, литий, пропранолол, гипоксия.

ВВЕДЕНИЕ. При адаптации к высотной гипоксии перестройка клеточного метаболизма направлена на запуск комплекса механизмов, компенсирующих недостаток кислорода. Важнейшими из них являются увеличение сопряженности окисления и фосфорилирования, усиление анаэробного синтеза макроэргов [1, 2]. Молекулярно-клеточный уровень реализации этих приспособительных механизмов должен обеспечиваться изменением активности систем вторичных мессенджеров. При этом вопрос об активности мессенджерных систем в цепи реакций при адаптации к недостатку кислорода остается открытым. И ответить на него не просто, так как фосфоинозитидный и аденилатциклазный механизмы находятся в центре биологических эффектов многих гормонов, нейромедиаторов и других физиологически активных веществ [3, 4]. В связи с этим, в каждый момент времени обе системы находятся под разнонаправленным влиянием целого ряда регуляторов.

Чтобы разобраться в этом вопросе, исследовали динамический баланс активностей мессенджерных систем при воздействии высотной гипоксии. При этом, для провокации нарушений мессенджерных элементов резистентности, проводили экспериментальное угнетение фосфоинозитидной системы ионами Li^+ , прерывающими метаболизм инозитольных липидов, на стадии превращения инозитолфосфата в инозитол [5] и аденилатциклазной системы пропранололом - блокатором β -адренорецепторов [6]. Функциональное состояние животных оценивали при помощи физиологических тестов на ориентированную активность и физическую работоспособность.

МЕССЕНДЖЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ПРИ ГИПОКСИИ

МЕТОДИКА. Эксперименты выполнены на крысах. Первая группа животных подвергалась воздействию высотной гипоксии (6000 м над ур. м.) в барокамере в течение 24-х часов. Вторая и третья группы также проходили 24-х часовую барокамерную экспозицию, при этом крысам второй группы в течение 8 дней предварительно вводили литий хлористый в дозе 50 мкг/г веса в сутки, а третьей, также в течение 8 дней вводили пропранолол - 5 мкг/г веса в сутки. Оба препарата вводили внутримышечно. Фосфатидилинозитол (PI), фосфатидилинозитол-4-фосфат (PIP) и фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) выделяли из ткани мозга (полушария) модифицированным методом Насамига [7]. Навеску (800 мг) гомогенизировали дважды с 10 мл хлороформ-метанол (1:1) в гомогенизаторе (тефлон-стекло). Гомогенат центрифугировали, к осадку добавляли 10 мл смеси хлороформ-метанол-HCl конц. (200:100:1,5), гомогенизировали и осаждали дважды, супернатант удаляли. Экстракт последовательно промывали, добавляя 0,2 объема 1 М HCl, 0,2 объема смеси хлороформ-метанол- $CaCl_2$ 0,02% (3:48:47) и 0,2 объема хлороформ-метанол-HCl 1 М (3:48:47). После первых двух промывок удаляли верхнюю фазу, после третьей - верхнюю и среднюю фазы. Экстракт нейтрализовали до pH 7-8 добавлением NH_4OH и упаривали под вакуумом. Фосфолипидные фракции разделяли используя тонкослойную хроматографию (ТСХ) в системе изопропанол-аммиак (2:1). Образцы идентифицировали с помощью свидетелей ("Sigma", США). Инозитолтрифосфат (IP_3) выделяли с применением ионообменной хроматографии на смоле дауэкс 1х8-400 в формиатной форме [8]. Циклический аденозинмонофосфат (сАМР) в гомогенате мозга определяли после осаждения белков 6% трихлоруксусной кислотой с применением ТСХ и идентификации радиоиммунологическими наборами ("Institute for Research, Production and Applications", Чехия). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254, в системе растворителей изопропанол-вода-аммиак (7:2:2, $R_f=0,61$) [9]. Пробы на физическую работоспособность и ориентировочную активность проводили по методикам Тернового [2]. Данные для конкретных экспериментальных точек в каждом независимом определении получали в пятикратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Модуляция мембранных фосфоинозитидов в первые часы барокамерной экспозиции была однотипной: отмечалось снижение их абсолютного содержания. Причем для PI этот процесс проходил с большей интенсивностью. Вероятно, эти условия инициировали фосфорилирование PI до PIP и PIP_2 . Эти события привели к тому, что доля полифосфоинозитидов в общей мембранной фракции инозитолсодержащих фосфолипидов несколько увеличилась. Обращал на себя внимание ранний период экспозиции, когда уровни липидных компонентов фосфоинозитидной системы имели наибольшее отклонение от исходных значений (рис. 1). Этот факт свидетельствовал об определенном "критическом" периоде (при заданных условиях), в течение которого фосфоинозитидная система проявляла максимальную активность. Наблюдаемое при более длительных сроках снижение интенсивности мобилизационных процессов обусловлено регуляторными взаимоотношениями как внутри фосфоинозитидной, так и с аденилатциклазной и гуанилатциклазной системами [3, 6].

Фосфоинозитидный ответ второй ("литиевой") группы на воздействие высотной гипоксии был однотипен с реакцией первой, однако, уступал ей по амплитуде на 25-32% ($p<0,02$). Предварительные инъекции пропранолола не оказывали влияние на фосфоинозитидную систему, однако, ингибировали активность аденилатциклазной, поскольку уровень сАМР в третьей группе был ниже, чем в первых двух. Однако, анализ данных по содержанию сАМР во всех трех группах, позволил сделать заключение об усилении активности аденилатциклазной системы при воздействии острой высотной гипоксии.

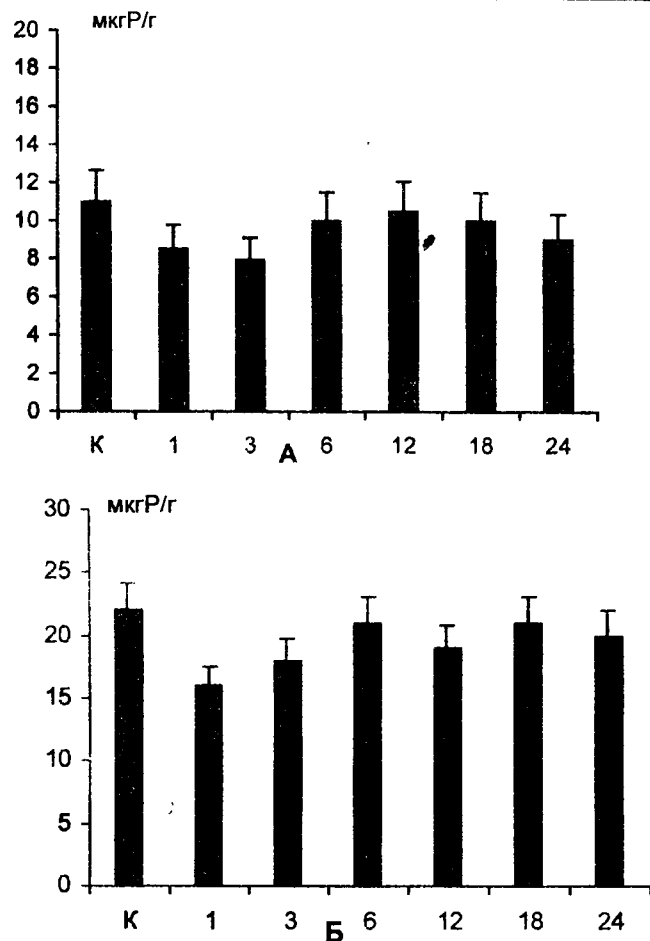


Рисунок 1

Содержание полифосфоинозитидов в полушариях мозга intactных крыс при острой барокамерной гипоксии (6000 м над ур. м.). Обозначения: А - PIP; Б - PIP₂; По оси ординат - микрограмм инозитидного фосфора на грамм ткани - мкгР/г; по оси абсцисс - время экспозиции в часах; К - контроль; * - статистически достоверное отличие от контроля.

Известно, что существует два основных пути взаимодействия между фосфоинозитидной и аденилатциклазной системами вторичных мессенджеров: синергизм (потенцирование, усиление) и антагонизм (ослабление) [6]. Угнетение одной из систем специфическим блокатором не оказывало ингибирующего влияния на вторую, в тоже время динамический баланс активностей фосфоинозитидной и аденилатциклазной систем показывал, что в данном случае имел место синергизм их действия. Потенцирование развивалось во времени примерно до 6 часов экспозиции, после чего наступала вторая фаза, которая характеризовалась снижением активности обеих систем (рис. 2). Причина такого возврата к исходному уровню остается не выясненной. Возможно, это связано с перестройкой чувствительности клеток-мишеней, а также включением других защитных механизмов, действующих по принципу обратной связи и снижающих эффекты стрессирующего агента [3, 10]. Поэтому не обнаружено пропорциональной зависимости силы мессенджерного ответа от времени гипоксического воздействия. Исходя из этих соображений, говорить о зависимости доза-эффект, здесь следует с большой осторожностью (если вообще следует).

Тестирование на физическую работоспособность и ориентировочную активность показало наличие прямой корреляционной связи между угнетением

МЕССЕНДЖЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ПРИ ГИПОКСИИ

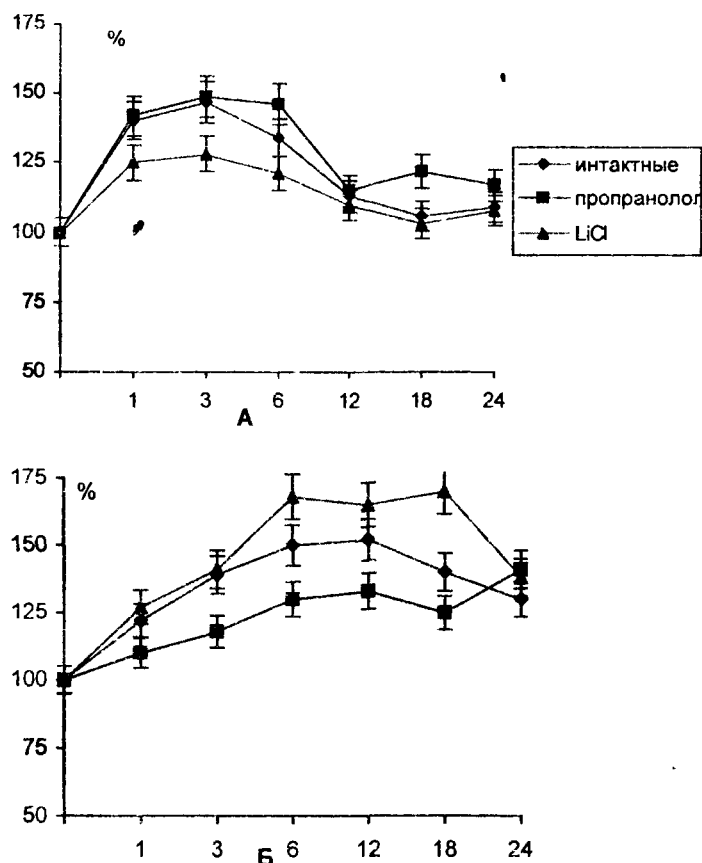


Рисунок 2

Уровень IP₃ и cAMP в полушариях мозга крыс при острой барокамерной гипоксии (6000 м. над ур. м.). Обозначения: А - IP₃; Б - cAMP; по оси ординат - % от контроля; по оси абсцисс - время экспозиции в часах.

мессенджерных систем и физиологическими пробами. При литиевой и пропранололовой блокаде коэффициенты корреляции составили $r = 0,95$ и $r = -0,71$ соответственно (физическая работоспособность). Барокамерная гипоксия изолированно и в сочетании с блокадой мессенджерного ответа также снижала физическую работоспособность и ориентировочную активность, причем у "литиевой" группы этот эффект был максимальным ($p < 0,02$).

На данном этапе исследований еще не отдифференцированы физиологические последствия блокады мессенджерных систем от изменений, связанных с ответом на высотную гипоксию. Тем не менее, можно заключить, что угнетение одной из систем внутриклеточных коммуникаций приводит к существенным сложностям в организации эффекторного ответа. Приведенные данные являются подтверждением универсальной роли двух сигнальных систем в регуляции физиологических процессов, причем один и тот же процесс может управляться одновременно фосфоинозитидной и аденилатциклазной системами, находящимися в постоянном взаимодействии. Второй вывод, вытекающий из первого, заключается в том, что конечный результат адаптационного акта, определяется типом сигнальной системы в целом, независимо от преимущественного воздействия того или иного блокатора на какой-либо конкретный элемент мессенджерного каскада.

ЛИТЕРАТУРА

1. Султанов Ф.Ф., Соболев В.И. (1991) Гормональные механизмы температурной адаптации. Ашхабад: Ылым, с. 133-145.
2. Яковлев В.М., Терновой В.А., Михайлов И.В. (1994) Мембраны и адаптация в высокогорье. Бишкек. Илим, с.12-66.
3. Романчиков Ю.М. (1991) Успехи совр. биол., **111**, 19-33.
4. Lundberg A.G. (1989) Inositol lipid phosphorylation and intracellular communication. Lund., pp. 5-42.
5. Silchce D.J., Durnes C.P. (1992) Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Disease, **1138**, 46-52.
6. Кухарь В.П., Луйк А.И., Мозилевич С.Е. (1991) Химия биорегуляторных процессов. Киев: Наукова Думка, с.255-290.
7. Nakamura T., Hatori Y., Yamada K., Ikeda M., Yuzuriha T. (1989) Anal. Biochem. **179**, pp. 127-130.
8. Findlay B.C. (1987) Biological membranes. A Practical Approach. IRL Press Limited., pp. 91-160.
9. Кулинский В.И., Зобова И.В. (1985) Биохимия, **50**, 15-20.
10. Меерсон Ф.З., Копылов Ю.Н. (1993), Вопр. мед. химии, **39**, №3, 6-13.

Поступила 28.08.2001

THE SECOND MESSENGER RESPONSE UNDER ALTITUDE CHAMBER TREATMENT.

A.A. Vishnevsky, V.M. Jakovlev, Z.I. Habibullova

Institute of High Altitude Physiology and Experimental Pathology, Kyrgyz Academy of Sciences,
Gorkogo Str. 1/5, Bishkek, 720048 Kyrgyz Republic;
tel.: 239352

The activity of phosphoinositide and adenylate cyclase systems of second messengers in rat brain were investigated under altitude chamber treatment (6000 m x 24 hours). Selective suppression of each messenger system was achieved by pretreatment of rats with either lithium chloride or propranolol for 8 days. Consequences of this treatment and/or hypoxia were evaluated by orientation behavior and physical exercise test. Administration of LiCl caused reduction of phosphoinositide level; hypoxia (6000 m) caused further impairments in the second messenger content. The synergism between phosphoinositide and adenylate cyclase systems was demonstrated.

Key words: phosphoinositide response, cAMP, lithium chloride, propranolol, hypoxia.