

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 612.613.1

ГОРМОНАЛЬНЫЙ И МЕССЕНДЖЕРНЫЙ ОТВЕТ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

А.А. Вишнеvский, Ч.О. Жапаралиева

*Институт горной физиологии Национальной академии наук
Кыргызской Республики*

Представленные в работе данные свидетельствуют о том, что при экстренной необходимости физиологических перестроек в организме (холод, недостаток кислорода и другие сигналы опасности) в первую очередь активируется аденилатциклазный сигнальный каскад. При долговременном воздействии экстремальных условий среды организму требуется иной характер взаимоотношений между первичными агонистами и эффекторными клетками. Эти новые координационные отношения обеспечиваются перестройками в Ca^{2+} -мобилизующей фосфоинозитидной системе (PI \rightarrow poly-PI).

Ключевые слова: вторичные мессенджеры, мембраны, гипоксия, пониженные температуры, адаптация.

Введение. Факторы внешней среды вызывают в многоклеточном организме сложную гамму нейрогуморальных сигналов. В клетках восприятие внешних сигналов и реализация эффекторного ответа являются функцией мембранных сигнальных (*мессенджерных*) систем. Механизмы сопряжения работы двух основных мембранных систем внутриклеточных коммуникаций – Ca^{2+} -мобилизующей фосфоинозитидной и аденилатциклазной при адаптации к экстремальным условиям среды до настоящего времени исследованы недостаточно. И, по-видимому, ответы здесь не могут быть однозначными, поскольку обе мессенджерные системы находятся в центре физиологических эффектов многих гормонов, нейромедиаторов, активных метаболитов и электрических импульсов.

В условиях экстремальной среды (гипоксия, холод) в динамике адаптационного процесса можно выделить две фазы изменения уровня гормонов в организме. В начале адаптации происходит активация гормональ-

ной системы, которая сопровождается повышением количества вырабатываемых гормонов. По достижении адаптации наступает вторая фаза, которая характеризуется снижением активности гормональной системы до исходного и даже более низкого уровня. Это снижение не связано с истощением желез внутренней секреции, так как при действии другого адаптирующего фактора их активность вновь возрастает [3].

Причина такого возврата остается не выясненной. Вероятно, это изменение активности связано с соответствующей перестройкой чувствительности клеток-мишеней, что в случае повышения их чувствительности должно закономерно вести к возврату активности гормональной системы к исходному уровню. При этом необходимо иметь в виду, что эффекторная чувствительность клеток-мишеней определяется динамическим балансом активностей двух основных систем вторичных внутриклеточных коммуникаций – Ca^{2+} -мобилизующей фосфоинозитидной и аденилатциклазной [9; 10].

Синергичные процессы в этих звеньях передачи гормонального сигнала способны изменить масштаб чувствительности клеток-мишеней. Поэтому наблюдаемое при длительной адаптации снижение активности гормональной системы есть не возврат к старым координационным отношениям между гормонами и клетками-мишенями, а своеобразный переход на новую ступень регуляции, обусловленную соответствующими изменениями в мембранных сигнальных системах.

Цель исследования. Выяснение корреляционных отношений между гормональным фоном и активностью систем внутриклеточных коммуникаций в условиях высокогорной среды.

Материалы и методы. Первая серия экспериментов посвящена выяснению характера взаимодействия гомонов и вторичных мессенджеров при адаптации в высокогорье. Экспериментальные животные – крысы – находились в горах (3200 м; Центральный Тянь-Шань, июль-август) в течение 30 дней. Для провокации нарушений гормональных элементов резистентности одну группу животных адреналэктомировали путем удаления правого надпочечника [5]. Во второй серии опытов исследовали фосфоинозитидный ответ при экзогенном введении норадреналина.

В плазме крови крыс определяли концентрацию адреналина и норадреналина с помощью флюориметрического метода на спектрофлюориметре «Хитачи» MPF-4. В качестве стандартов использованы препараты фирмы «Ренал» (Венгрия). Уровень адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортикостерона и содержание тироксина определяли радиоиммунологическим методом [3]. Продукты перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты определяли по методикам, описанным И.Г. Короткевич [2].

Полифосфоинозитиды (poly-PI) – фосфатидилинозитол-4-фосфат (PIP) и фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP₂) – выделяли из ткани мозга (полушария) и печени крыс мо-

дифицированным методом Дж. Финдлей [7] и последующим разделением на пластинах для тонкослойной хроматографии Silufol UV-254 (Чехия). Хроматографию проводили при комнатной температуре в системе изопропанол : аммиак (2:1 по объему). Идентифицировали образцы с помощью стандартных свидетелей и по коэффициенту форетической подвижности (Rf). сАМР в гомогенате тканей (мозг, миокард) определяли после осаждения белков 6 % трихлоруксусной кислотой с применением тонкослойной хроматографии и идентификации стандартными наборами (Institute for research, production and applications, Чехия). Хроматографию выполняли на пластинах Silufol UV-254 в системе растворителей изопропанол : вода : аммиак, в объемном отношении 7:2:2; Rf=0,61. Количественное определение указанных вторичных мессенджеров и фосфолипидов проводили по содержанию фосфата [4].

Данные для экспериментальных точек в каждом независимом определении получали в 6-кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики, применяя t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Наиболее важными физиологическими механизмами адаптации к физическим факторам гор, как известно, являются возбуждение гипоталамо-гипофизарной системы и усиленная продукция глюкокортикоидов и катехоламинов [1]. Полученные результаты явились подтверждением этой модели: в течение первых 3-х суток адаптации в высокогорье в плазме крови крыс уровень кортикостерона и адреналина повысился в 2,6–2,9 раза, содержание норадреналина повысилось к 7-м суткам (рис. 1). Отмечено достоверное увеличение концентрации АКТГ к 3-м суткам ($p < 0,02$). Помимо указанных эндокринных каскадов физические факторы гор в ранние сроки (до 3-х суток) вызывали выраженный секреторный ответ щитовидной железы. Содержание общего тироксина в крови в этот период превышало контрольный уровень в 1,3–1,5 раза.

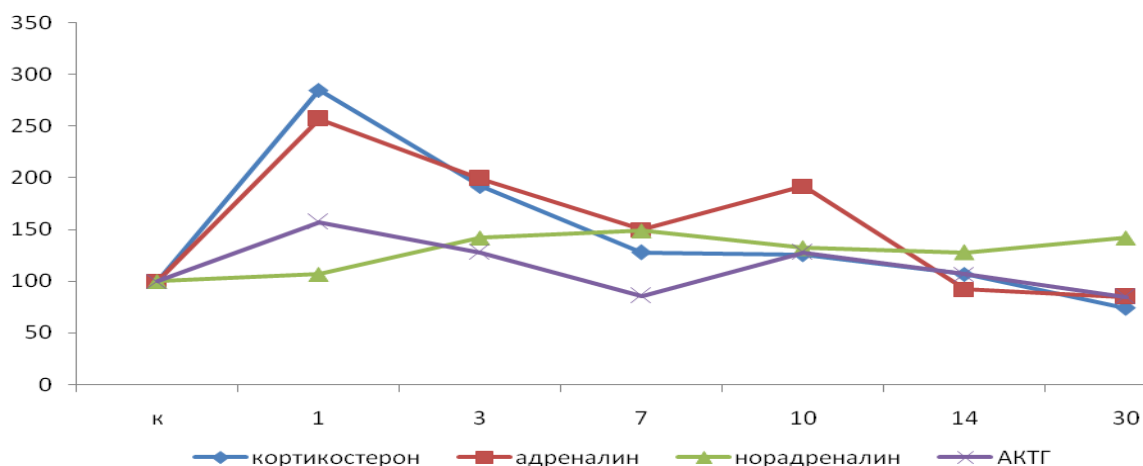


Рис. 1. Содержание гормонов в плазме крови крыс при 30-суточной адаптации к условиям высокогорья (3200 м; +10 °С).

Обозначения: по оси абсцисс – дни адаптации; по оси ординат – содержание гормонов в % к контролю; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,02$; *** – $p < 0,01$; $n = 6$

Гормональный ответ адренал-эктомированных крыс был однотипен с реакциями интактных животных, однако уступал последним по амплитуде на 22–29 % ($p < 0,05$). В этой группе животных, в отличие от интактных, к 7-м суткам наблюдалось компенсаторное увеличение массы оставшегося надпочечника с $12,2 \pm 0,4$ мг до $18,3 \pm 0,8$ мг.

Так как важнейшие эффекты гормонов и катехоламинов опосредуются системами вторичных мессенджеров, то на следующем эта-

пе реализации гормонального сигнала в клетке начинается образование сАМР и инозитолфосфатов [6; 11]. В течение всего периода адаптации в горах накопление сАМР в коре мозга интактных и адренал-эктомированных крыс было довольно интенсивным, особенно в ранние сроки. Полученные данные свидетельствуют, что в случае с гипоксической экспозицией, в отличие от холодового воздействия, имеет место синергизм двух мессенджерных систем (рис. 2).

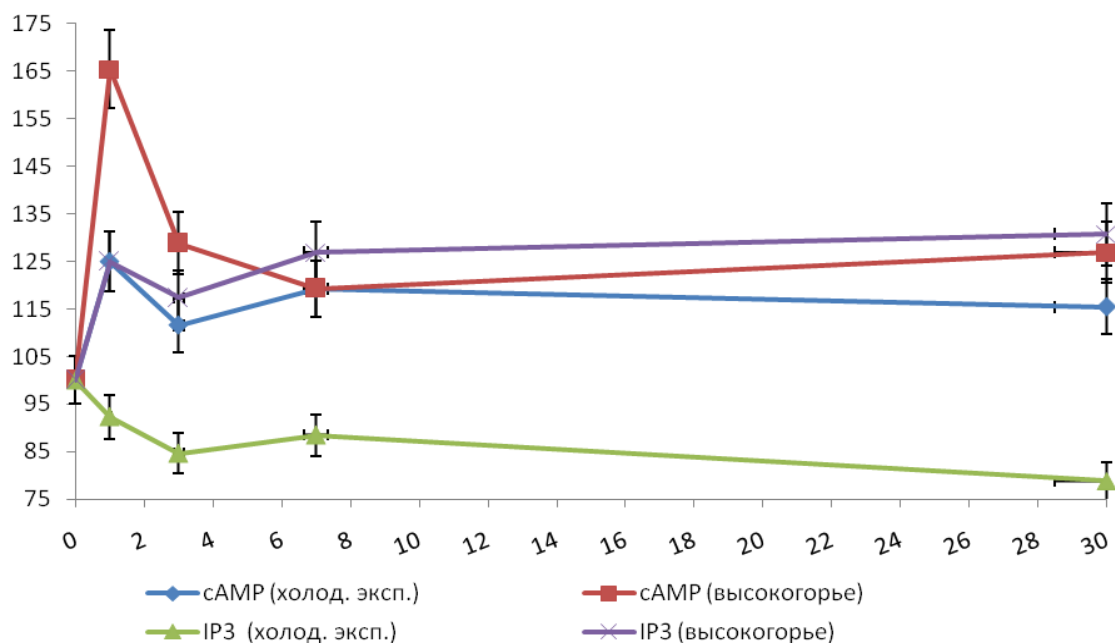


Рис. 2. Активность мессенджерных систем в ткани мозга крыс при воздействии пониженных температур (760 м; +3 °С; 30 суток) и физических факторов высокогорья (3200 м; +10 °С; 30 суток).

Обозначения: по оси ординат – содержание вторичных мессенджеров в % от контроля; по оси абсцисс – сутки экспозиции животных; $n=6$

Различия в активности систем ВМ между адренал-эктомированными и интактными крысами наблюдались с 7-х по 10-е сутки пребывания на высоте. В течение этого периода у адренал-эктомированных крыс уровень инозитолфосфатов был ниже, а концентрация сАМР – выше, чем у интактных. Очевидно, что гормональный фон оперированных животных (более низкая концентрация АКТГ, кортикостерона и катехоламинов) вызывает другие динамические характеристики мессенджерных систем. Снижение уровня инозитольных ВМ, наблюдавшееся у адренал-эктомированных крыс на 7-е–10-е сутки, является регуляторным ответом, обеспечиваю-

щим приспособительные перестройки клеточного метаболизма. Кроме того, увеличение массы оставшегося надпочечника свидетельствует о том, что эффекты ВМ проявляются не только в активации или угнетении какого-либо метаболического процесса, но и в способности оказывать влияние на функцию клетки через ее генный аппарат [11; 12].

Перестройки в фосфоинозитидной системе заключались в повышении доли полифосфоинозитидов (poly-PI): PIP и PIP₂ в общей мембранной фракции инозитолсодержащих фосфолипидов, причем у адренал-эктомированных – в несколько большей степени (табл. 1).

Таблица 1

Уровень poly-PI в полушариях мозга адренал-эктомированных крыс при 30-дневной адаптации в высокогорье (3200 м; +10 °С)

Дни адаптации	Интактные		Адренал-эктомированные	
	PIP	PIP ₂	PIP	PIP ₂
Контроль	9,4±1,8	21,3±2,6	9,6±2,2	20,2±1,7
1	9,1±2,0	21,2±2,7	9,2±1,6	24,4±2,5
7	9,3±1,5	23,8±2,6	13,5±2,1*	22,1±2,2
14	9,8±1,5	23,0±2,2	10,2±2,2	26,7±2,7*
30	10,5±1,7	23,7±2,0	10,5±1,7	24,0±2,3

Примечание. poly-PI даны в микрограммах фосфоинозитидного фосфора на грамм ткани мозга (мкгP/г); n=6; * – p<0,05.

Сдвиг от PI к poly-PI развивался во времени и достиг максимума к 7–14 суткам (рис. 3, 4), когда активность эндокринных систем снизилась; таким образом, в динамике адаптационного процесса наступала вторая фаза. Известно, что именно poly-PI являются основными источниками вторичных мессенджеров – диацилглицерола и инозитолфосфатов [11]. Поэтому количественные изменения содержания poly-PI в мембранах – объективный показатель изменения уровня трансдукции первичного сигнала в условиях длительного воздействия возмущающего фактора.

Следовательно, указанные события ведут к переходу на новую ступень регуляции, обусловленную изменением характера взаимодействия между эндокринными и мессен-

джерными системами. Это значит, что повышение чувствительности мембран в процессе адаптации может обеспечиваться за счет возникновения других количественных соотношений между PI и poly-PI. Кроме того, не исключается возможность адаптивных перестроек на рецепторном уровне [12].

Что произойдет на участке сопряжения эндокринных сигналов с сигнальными системами, если гормональная активность будет не снижаться, а нарастать? Для ответа на этот вопрос применили модель с поддержанием высокого уровня норадреналина путем инъекций в возрастающих дозах. Препарат вводили в течение 14 дней (общая доза – 35 мг/кг), когда его содержание в крови повышалось в 6–8 раз.

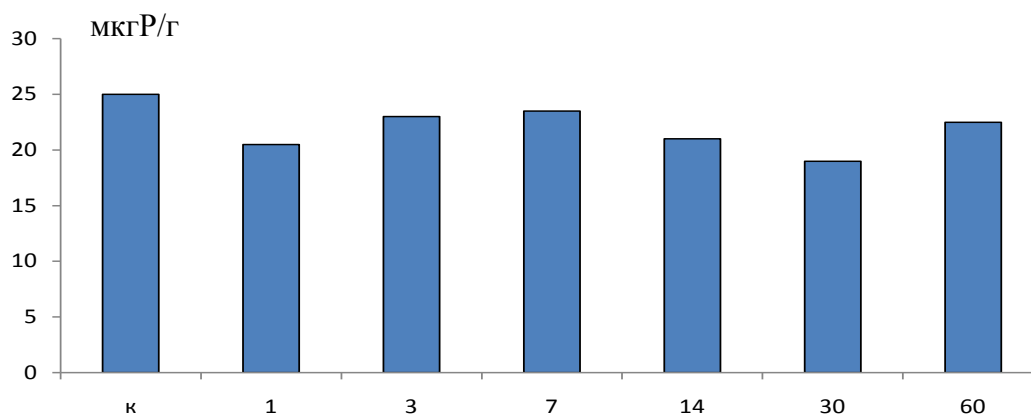


Рис. 3. Содержание фосфатидилинозитола (PI) в полушариях мозга крыс при 60-дневной адаптации в высокогорье (3200 м).
 Обозначения: по оси ординат – мкг инозитидного фосфора на 1 грамм ткани; по оси абсцисс – дни адаптации; К – контроль; n=6; * – p<0,05

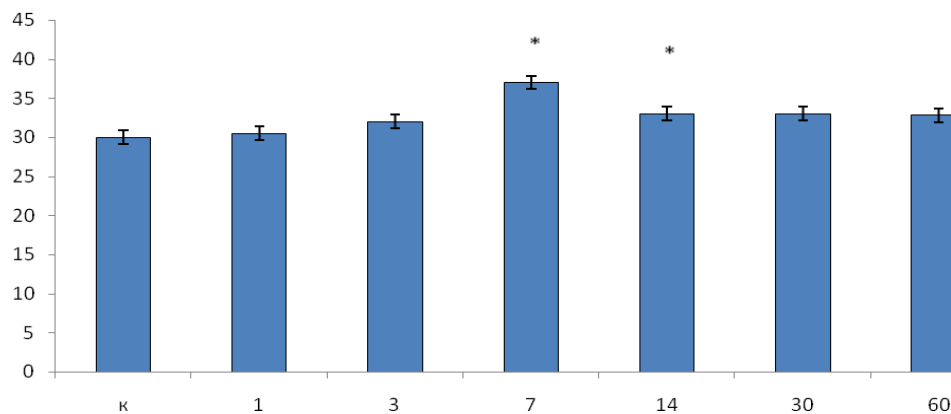


Рис. 4. Содержание полифосфоинозитидов (poly-PI) в полушариях мозга крыс при 60-дневной адаптации в высокогорье (3200 м).
 Обозначения: по оси ординат – мкг инозитидного фосфора на 1 грамм ткани; по оси абсцисс – дни адаптации; К – контроль; n=6; * – p<0,05

Как и следовало ожидать, эффект подобных нагрузок норадреналином выразился в инициации свободно-радикальных процессов и в повреждении миокарда. После однократного введения норадреналина (через 2 часа) в миокарде отмечалось увеличение концентрации продуктов ПОЛ и снижение активности ферментов антиоксидантной защиты. Содержание диеновых конъюгатов и шиффовых оснований возросло на 60 % и 38 % соответственно, активность супероксиддисмутазы была снижена на 43 %, а каталазы – на 28 %. При введении препарата в течение 7 дней сохранялось высокое содержание продуктов ПОЛ (на уровне 1-го дня нагрузки), активность ферментов антиоксидантной защиты несколько повысилась по сравнению с первым днем, хотя и оставалась ниже исходной. К 14-м суткам, несмотря на продолжение введения норадреналина в возрастающих до-

зах, отмечена нормализация уровня шиффовых оснований, содержание диеновых конъюгатов оставалось на 49 % выше исходного. Активность супероксиддисмутазы приблизилась к норме, а каталазы оставалась сниженной на 26 % (табл. 2).

Очевидно, что избыток норадреналина активизирует ПОЛ – систему деградации мембранных и клеточных липидов. Возможно, здесь лежит ключ к пониманию совсем иной чувствительности органов и систем к гормонам (агонистам, первичным мессенджерам) при адаптации в высокогорье, так как возможно допустить, что агонисты (в данном случае норадреналин) запускают в адаптирующемся организме качественно иной, модифицированный перекисным окислением липидов уровень функционирования мессенджерных систем.

Таблица 2

Изменение показателей ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в миокарде крыс при нагрузке норадреналином (35 мг/кг веса; 14 дней)

Сроки введения норадреналина	n	Дниевые конъюгаты (нмоль/липидов)	Шиффовые основания (усл. ед. / г ткани)	Супероксид-дисмутаза (усл. ед. / г ткани)	Каталаза (усл. ед. / г ткани)
Контроль	10	0,26±0,03	2,0±1,0	66,2±6,1	27,4±1,3
2 часа	8	0,42±0,05**	2,8±0,3*	37,6±6,7	19,8±1,7**
7 дней	9	0,40±0,05*	2,8±0,3*	48,1±4,5	22,9±0,9**
14 дней	9	0,39±0,04*	2,0±0,1	56,7±5,4	20,4±1,3**

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,02$.

В самом миокарде функциональные и морфологические изменения были весьма существенными. Уже после 7 дней введения норадреналина отмечалось полнокровие и спазм сосудов, отек стромы, наблюдались очаги гипертрофированных кардиомиоцитов с частичной ишемизацией, глыбчатым распадом и некрозом. К 14-м суткам эти структурные и некротические изменения носили более интенсивный характер, кроме того, отмечено увеличение диаметра кардиомиоцитов на 50 % ($p < 0,01$).

Высокий уровень норадреналина в крови привел к снижению содержания мембранного

PIP₂ к 3-м суткам с 21,8±2,4 мкгР/г ткани мозга (в контроле) до 16,8±2,0 мкгР/г ($p < 0,02$). Эта динамика сохранялась до конца эксперимента (рис. 5). Уровень PIP существенно не менялся. Следовательно, в экспериментах с избыточным количеством первичного агониста, когда в крови опытных животных искусственно поддерживали высокий уровень норадреналина, наблюдался обратный процесс: перераспределение от poly-PI к PI, что снижало деструктивный эффект норадреналина.

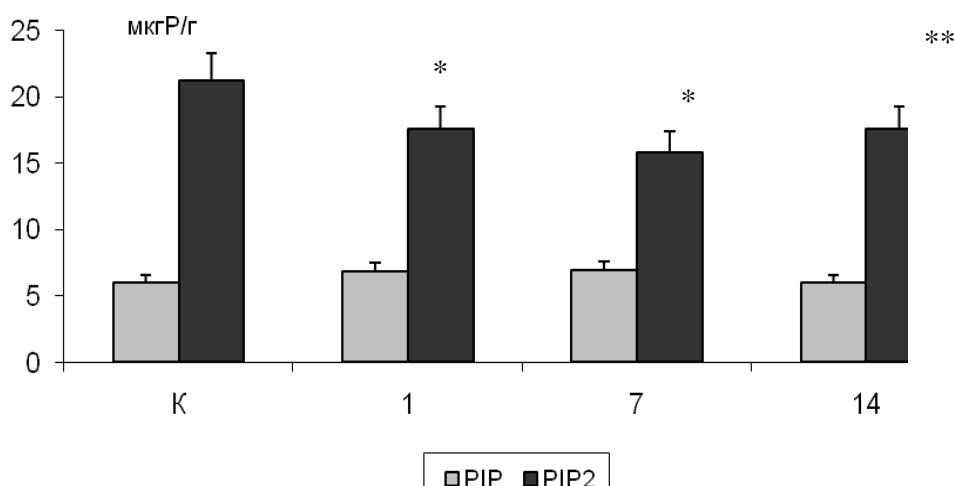


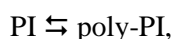
Рис. 5. Содержание полифосфоинозитидов в мозге крыс при введении норадреналина (14 дней).
Обозначения: по оси ординат – мкгР/г ткани; по оси абсцисс – сроки введения норадреналина (дни);
К – контроль; n = 6; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,02$

Наблюдаемая для свободнорадикальных процессов тенденция к восстановлению исходной интенсивности свидетельствовала о включении защитных систем, причем динамика содержания poly-PI наводила на мысль об участии фосфоинозитидов в формирова-

нии этих лимитирующих механизмов, снижающих деструктивные эффекты повреждающего агента – норадреналина. При этом кроме функциональной регуляции в виде активации ферментов антиоксидантной защиты [2] отрицательное действие фактора, несмот-

ря на его нарастание, могло блокироваться на участке проведения сигнала в клетку за счет снижения доли poly-PI.

Анализ данных позволяет сделать следующее логическое построение: обратимые процессы, происходящие в мембранах, которые можно выразить в виде динамической формулы:



и есть тот достаточно простой *мембранный механизм*, регулирующий эффекторный ответ клеток на различные по характеру, силе и длительности внешние сигналы.

Пока еще не отдифференцированы пороговые диапазоны концентраций гормонов и нейромедиаторов, при которых происходит адаптивное повышение или снижение содержания poly-PI, меняющее чувствительность клеточных мембран. В то же время ясно, что фосфоинозитидная мессенджерная система может функционировать в нескольких «режимах». Находясь в одном из них, система обеспечивает определенную степень регуляции, адекватную силе гормонального сигнала. Если этот сигнал становится больше некоторой пороговой величины, то в системе (очевидно, благодаря механизмам обратной связи) формируется новый стационарный уровень, меняющий чувствительность клеточных мембран.

Успешная адаптация многоклеточного организма к меняющимся условиям среды требует согласованного функционирования отдельных органов и их систем. Это достигается сочетанием определенных наборов мембранных рецепторов, обеспечивающих кооперативное включение одних и одновременное выключение других клеточных сигнальных каскадов [8]. Причем эти сигнальные системы находятся под влиянием одних и тех же интегрирующих факторов: гормонов, электрических импульсов, нейромедиаторов [6]. Исходя из этой точки зрения, становится понятной эволюционная обусловленность существования именно двух основных реципрокных систем клеточной сигнализации. В общем, схематизированном виде можно принять, что при экстренной необходимости физиологических перестроек в орга-

низме (недостаток кислорода, холод и другие сигналы опасности) в первую очередь активируется cAMP-сигнальный каскад. На системном уровне состояние тревоги и повышенной физической активности сопровождается cAMP-зависимым усилением работы сердца, расширением бронхов и сосудов, питающих скелетную мускулатуру, мозг, миокард [1]. При долговременном воздействии экстремальных условий среды организму требуется иной характер взаимоотношений между первичными агонистами и эффекторными клетками. Эти новые координационные отношения обеспечиваются как перестройками в Ca^{2+} -мобилизующей фосфоинозитидной системе ($PI \rightleftharpoons poly-PI$), так и структурной модификацией бислоя в виде фосфолипидной и жирно-кислотной рекомпозиции [1; 2]. Возникающие при этом длительная потенциация, закрепление нового уровня липид-белковых взаимодействий и микровязкости мембраны направлены на оптимизацию физиологических процессов в измененных внешних условиях.

Выводы

1. Снижение активности эндокринных каскадов во второй фазе адаптации в высокогорье (3200 м; 14 суток) сопровождается увеличением доли полифосфоинозитидов в мембранах, что определяет возникновение новых координационных отношений между гормонами и вторичными мессенджерами.

2. Деструктивные эффекты норадrenalина, при введении его в возрастающих дозах, могут снижаться в результате блокады сигналов в клетку, обусловленной перестройками в фосфоинозитидной мессенджерной системе.

3. Суммарный гормональный фон организма в ранние сроки адаптации в высокогорье (3200 м; до 30 дней) обуславливает синергичное взаимодействие двух основных систем внутриклеточных коммуникаций. Причем потенцирование развивается во времени в течение первых двух недель адаптации, после чего в Ca^{2+} -мобилизующей системе отмечены долговременные адаптивные перестройки в виде повышения доли poly-PI, изменяющих чувствительность клеток-мишеней.

1. Агаджанян, Н.А. Физиология человека / Н.А. Агаджанян. – М. : РУДН, 2002. – 346 с.
2. Короткевич, И.Г. Влияние антигипоксантов на течение острой церебральной ишемии в условиях низко- и высокогорья : автореф. дис. ... канд. мед. наук / И.Г. Короткевич. – Бишкек : КРСУ, 2008.
3. Медведев, В.И. Закономерности взаимодействия гормональных влияний и собственной активности клеток в процессе адаптации / В.И. Медведев, Н.И. Косенков // Физиология человека. – 1989. – Т. 13, №1. – С. 103–110.
4. Пушкарев, В.М. Участие сАМР в регуляции минералкортикоидной функции надпочечников ионами калия / В.М. Пушкарев, Н.Д. Тронько, А.С. Микоша // Биохимия. – 1989. – Т. 54, вып. 2. – С. 323–327.
5. Фадеев, В.В. Этиологическая и клиническая структура первичной хронической надпочечниковой недостаточности: ретроспективный анализ 431 случая / В.В. Фадеев, И.И. Бузиашвили, И.И. Дедов // Проблемы эндокринологии. – 1998. – Т. 44, №6. – С. 22–26.
6. Фаллер, Д. Молекулярная биология клетки / Д. Фаллер, Д. Шилдс. – М. : Бином, 2006. – 256 с.
7. Финдлей, Дж. Биологические мембраны, методы / Дж. Финдлей, У. Званз ; пер. с англ. – М. : Мир, 1990. – 347 с.
8. Lant, B. An overview of stress response and hypometabolic strategies and contrasting signals with the mammalian system / B. Lant, K. Storey // International J. of Biological Science. – 2010. – V. 6. – P. 9–50.
9. Mahadelo, D. P3K activity controls the chemoattractant-mediated activation and adaptation of adenylyk cyclase / D. Mahadelo, M. Jahoka // МВос. – 2006. – V. 17, №1. – P. 357–366.
10. Posta, M. Sensitization of Dictyostelium chemotaxis by phosphoinositid-3-kinase mediated self-organizing signaling pathes / M. Posta, J. Roelof, J. Goedhart // J. of cell Sciences. – 2004. – V. 117. – P. 2925–2935.
11. Eddy, S.F. Dynamic use of DNA arrays: heterologous probing for gene discovery exploration of animal adaptations in stressfull environment. Cell and molecular responses to stress / S.F. Eddy, K. Storey. – Amsterdam : Elsevier, 2002. – V. 3. – P. 315–325.
12. Yao, Y. Interaction with phosphoinositides confers adaptation onto the TRPV1 pain receptor / Y. Yao, F. Qin // PLOS Biology. – 2009. – V. 7, №2. – P. 1371–1380.

HORMONAL AND MESSENGERS RESPONSE UNDER EXTREME CONDITIONS

A.A. Vishnevskii, C.O. Japaraliev

*Institute of High Altitude Physiology of National Academy of Science
of the Kyrgyz Republic*

Represented in the article data show, that at emergency necessity of physiological reconstructions in organism (cold, deficient of oxygen and other signals of dangerous) at first activate adenylyl cyclase signal cascade. At long time action of extreme conditions of environment to organism to be needed other character interaction between first agonist and effector cells. This new coordination relations provide and by reconstructions in Ca²⁺-mobilizing phosphoinositide system (PI \rightarrow poly-PI).

Keywords: second messengers, cell membranes, hypoxia, low temperatures, adaptation.