

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 615.357

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И НЕКОТОРЫХ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ В ГРУППАХ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

Ч.О. Жапаралиева, И.П. Мухамедова, А.А. Вишневский

Институт горной физиологии НАН КР

Исследованы особенности термодинамических характеристик бислоя эритроцитов и фосфоинозитидного состава плазматических мембран в группах крыс, различающихся по устойчивости к гипоксии. Инфракрасный ИК-спектральный анализ выявил, что у высокоустойчивых крыс после 75-суточного пребывания в высокогорье (3200 м) термодинамические характеристики более разнообразны и превосходят по амплитуде соответствующие показатели у средне- и низкоустойчивых к гипоксии животных.

Кариометрия показала, что у низкоустойчивых к гипоксии животных к 30-м суткам тренировки в барокамере процессы экспрессии генома имели глубокий характер. Таким образом, организм низкоустойчивых крыс «нуждался» в более радикальных перестройках внутриклеточного метаболизма для обеспечения приспособительного гомеостаза. Различные стратегии приспособительных модификаций фосфоинозитидных источников мессенджеров у крыс с неодинаковой устойчивостью к гипоксии свидетельствовали о возможности формирования индивидуальных адаптационных моделей в ответ на идентичное возмущающее действие.

Ключевые слова: индивидуальная устойчивость к гипоксии, эритроцитарные мембраны, ИК-спектральный анализ, полифосфоинозитиды

Введение. Адаптивная специализация функций любой клетки сопровождается модификацией какого-либо участка плазматических мембран за счет молекулярных перестроек или образованием новых мембран [2]. Подобная специализация может быть закреплена эволюционно, в виде генетической программы [9]. Следовательно, индивидуальная устойчивость к недостатку кислорода и программы этой устойчивости реализуются не только в особенностях функционирования регуляторных, транспортных и эффекторных систем, но и в структуре, ответственной за уровень диффузии кислорода к гемоглобину, – в мембранах эритроцитов.

Спектральный анализ эритроцитарных мембран добровольцев после их 150-дневного пребывания в условиях высокогорья (3800–4000 м над ур. м.) выявил признаки появления участков с измененной упорядоченностью – кластеров. Кроме того, отмечено изменение относительной микровязкости мембран [8]. Остается неясным, являются ли эти изменения приспособительной перестройкой, направленной на облегчение диффузии кислорода и других веществ в клетку (или из нее) или это признак структурных повреждений мембран, вызванных активацией свободно-радикальных процессов. Очевидно, что связь кластеризации и рекомпози-

ции липидного бислоя с адаптацией к высотной гипоксии можно будет считать доказанной только после экспериментальной проверки наличия корреляции между спектральными характеристиками мембран и индивидуальной выносливостью организмов. Данная проверка стала одной из задач настоящей работы.

Помимо выяснения особенностей молекулярной структуры бислоя для понимания общих и индивидуальных механизмов резистентности к недостатку кислорода важна оценка фосфолипидного состава мембран и вклад каждого отдельного вида фосфолипида. Дело в том, что в условиях гипоксической гипоксии и пониженных температур имеет место фосфолипидная и жирно-кислотная композиция, специфическая для каждого вида тканей [7]. Этот факт дает основание полагать, что фосфолипидная композиция бислоя может нести ответственность за устойчивость, в том числе индивидуальную, к гипоксической гипоксии и другим экстремальным факторам среды. Чтобы выяснить, связана ли устойчивость к гипоксии с особенностями структуры и фосфолипидной композиции плазматических мембран, крыс, перед воздействием гипоксического фактора, разделяли на группы низко-, средне- и высокоустойчивых к гипоксии животных.

Цель исследования. Идентифицировать групповые особенности термодинамических характеристик бислоя эритроцитов и фосфолипидного состава плазматических мембран при воздействии экстремальных факторов среды.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах, прошедших 30- и 75-дневную экспозицию в высокогорье (3200 м над ур. м.; июль-август; Центральный Тянь-Шань). Часть животных подвергалась гипоксической тренировке в стационарных условиях, в барокамере с проточно-вытяжной вентиляцией (6000 м над ур. м.; 6 часов в сутки; 30 дней). Животных за 30 дней до экспозиции в барокамере разделили по принципу устойчивости к гипоксии [13]. После воздействия барокамерной гипоксии изучали сосудистые и тканевые реакции головного мозга, а также изменения в супраоптико-нейрогипо-

физарной системе [10]. В группах крыс после тренировки в барокамере в тканях мозга и печени определяли содержание мембранных фосфолипидов – компонентов фосфоинозитидной мессенджерной системы – фосфатидилинозитола (PI) и полифосфоинозитидов (poly-PI): фосфатидилинозитол-4-фосфата (PIP) и фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP₂) модифицированным методом Т. Nakamura [14]. Навеску (400 мг) гомогенизировали дважды в 8 мл смеси хлороформ : метанол (1:1 по объему) в гомогенизаторе типа тефлон-стекло. Центрифугировали, к осадку добавляли 8 мл смеси хлороформ : метанол : HCL-конц. (200:100:1,5 по объему). Гомогенизировали дважды, супернатант удаляли. Экстракт промывали последовательно с 0,2 объема 1 М HCl, с 0,2 объема смеси хлороформ : метанол : CaCl₂ 0,02 % (3:48:47 по объему) и с 0,2 объема смеси хлороформ : метанол : HCl 1 М (3:48:47 по объему). После первых двух промывок удаляли верхнюю фазу, после третьей – верхнюю и среднюю фазы. Экстракт нейтрализовали до pH 7–8 добавлением NH₄OH и упаривали под вакуумом, после чего аликвоту наносили на пластины для тонкослойной хроматографии Silufol UV-254 (Чехия). Хроматографию проводили при комнатной температуре в системе изпропанол : аммиак (2:1 по объему). Идентифицировали образцы с помощью стандартных свидетелей и по коэффициенту форетической подвижности (Rf).

Эритроцитарные мембраны выделяли методом осмотического шока. Молекулярно-структурный статус бислоя оценивали методом инфракрасной (ИК) спектроскопии на спектрофотометре Specord M80 (Германия) в диапазоне частот от 4000 до 900 см⁻¹. Метод основан на анализе спектров трансмиссии электромагнитных волн инфракрасного диапазона химическими связями фосфолипидных компонентов мембран и позволяет получать *интегральную* количественную информацию о состоянии липидного бислоя [6; 12]. ИК-спектры сняты в температурном диапазоне от 0 °C до +50 °C с шагом +5 °C. В физиологическом диапазоне (с +20 °C до +40 °C) шаг составлял 2 °C.

Разницу средних величин оценивали по

t-критерию Стьюдента и вероятности p , которую признавали статистически значимой при $p < 0,05$. Данные для конкретных экспериментальных точек в каждом независимом определении получали в 6-кратной повторности.

Результаты и обсуждение. ИК-спектральный анализ бислоя эритроцитов в группах крыс с разной устойчивостью к гипоксии

При изучении термодинамических характеристик эритроцитарных мембран в группах крыс, различающихся по устойчивости к гипоксии, был проведен ИК-спектральный анализ бислоя. На рис. 1 показаны различия термодинамических характеристик эритроцитарных мембран в группах крыс после 75-дневной адаптации в высокогорье (3200 м). Фоновые термодинамические пара-

метры по CH_2 -группам жирных кислот мембранных фосфолипидов у низко-, средне- и высокоустойчивых к гипоксии крыс сходны, но есть особенные для каждой группы локальные фазовые переходы. Под фазовым переходом понимается переход бислоя из жидкого состояния в кристаллическое (или гелеобразное) при понижении температуры до определенного значения [3]. Температура перехода оказывается ниже – мембрану труднее заморозить, если углеводородные цепи короткие или в них содержатся двойные связи. При меньшей длине цепи взаимодействие углеводородных «хвостов» становится менее вероятным, а изломы, вызванные наличием двойных связей, мешают более компактной упаковке фосфолипидных «хвостов». [9].

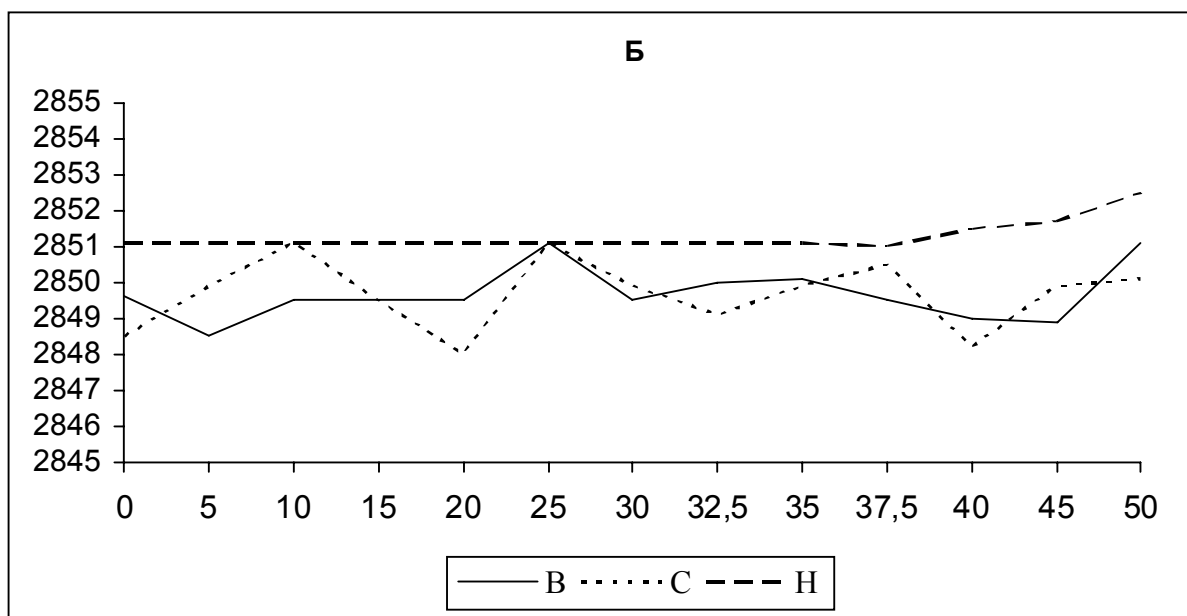


Рис. 1. Частота колебаний симметричных CH_2 -групп фосфолипидов эритроцитарных мембран крыс с различной устойчивостью к гипоксии после 75-дневной адаптации в высокогорье (3200 м).

Обозначения: по оси ординат – частота поглощения; по оси абсцисс – температура инкубации в °C; В – высокоустойчивые к гипоксии крысы, С – среднеустойчивые, Н – низкоустойчивые.

Фазовые переходы в группах имеют линейный характер. На третьи сутки адаптации в высокогорье во всех группах появляются ярко выраженные фазовые переходы с началом в пределах $17,3^\circ\text{C}$. Максимумы переходов в группах различны: у высокоустойчивых крыс – 33°C (частота трансмиссии ИК-волн – 2923 см^{-1}), у среднеус-

тойчивых – $27,5^\circ\text{C}$ (частота трансмиссии ИК-волн – $2923,5\text{ см}^{-1}$), а у низкоустойчивых – 27°C (частота трансмиссии ИК-волн – 2924 см^{-1}). Поскольку фазовые переходы, инициируемые температурой, являются объективной характеристикой структуры бислоя, есть основания говорить о различной структурной организации эритроцитар-

ных мембран в группах с различной устойчивостью к недостатку кислорода и при адаптации к высокогорью. Вместе с тем инициация локальных фазовых переходов во всех группах смещается с +15 °С к +10 °С. Эти адаптационные и термодинамические различия колебаний СН₂-групп, очевидно, определяются различиями фосфолипидного и жирно-кислотного состава эритроцитарных мембран, имеющими место при разных сроках адаптации в высокогорье [4]. Судя по изменению термодинамических характеристик, структурные липидные компоненты и липид-белковые взаимодействия меняются по мере адаптации.

Известно, что симметричные колебания жирно-кислотных структур способствуют образованию кинков (дефектов в упаковке) и, следовательно, увеличению проницаемости для гидрофильных веществ [2]. Как раз этот признак более свойственен на 75-й день адаптации средне- и высокоустойчивым к гипоксии животным по сравнению с низкоустойчивыми. Стартовые локальные симметричные колебания в высоко- и среднеустойчивых группах начинаются при +20 °С, тогда как у низкоустойчивых – при +10 °С. У средне – и высокоустойчивых групп сохраняется картина сложных фазовых переходов, тогда как у низкоустойчивой группы эта функция стремится к исходным величинам. Для низкоустойчивой группы характерна большая доля белков с неупорядоченной конформацией, выявляемая в физиологических диапазонах инкубации – от +20 °С до +40 °С.

Таким образом, полученные ИК-спектральные характеристики бислоя эритроцитов свидетельствуют о том, что уже к третьим суткам адаптации в высокогорье различная групповая модификация липидных и белковых структур ведет к особенностям фазовых переходов. Кроме того, ИК-спектральный анализ эритроцитарных мембран крыс, адаптирующихся в высокогорье, продемонстрировал, что группы с различной устойчивостью к гипоксии характеризуются своими особенностями ротации концевых СН₃-групп и величины гидрофобных взаимодействий между белками и

липидами. У высокоустойчивых крыс термодинамические ИК-спектральные характеристики более разнообразны и превосходят по амплитуде соответствующие показатели у средне- и низкоустойчивых животных.

Фосфоинозитидный ответ. Известно, что низкоустойчивые к недостатку кислорода крысы по сравнению с высокоустойчивыми характеризуются неэкономичным расходом кислорода – на единицу массы ткани в единицу времени тратят его больше чем высокоустойчивые [9]. Различия в метаболизме сочетаются с различной мембранной стратегией адаптации к воздействию физических факторов высокогорной среды. Высокоустойчивые к гипоксии крысы отличаются высоким уровнем и глубиной модификации фосфолипидного и жирно-кислотного состава мембран, тогда как у низкоустойчивых крыс адаптивная модификация фосфолипидного и жирно-кислотного состава плазматических и митохондриальных мембран выражена слабее [7]. Можно было ожидать, что эти группы животных будут различаться и по характеру изменений мессенджерной регуляции приспособления. И действительно, в мозге высокоустойчивых крыс произошло более существенное, чем у низкоустойчивых крыс, повышение содержания фосфолипида PI (источника полифосфоинозитидов) на третьи сутки тренировки в барокамере – 121,0±5,6 % (p<0,05) и 116,2±14,4 % (p<0,05) соответственно. На 7-е и 30-е сутки экспозиции уровень PI в обеих группах был близок к контрольному как в ткани мозга, так и в печени. Для полифосфоинозитидов мозга также отмечалось незначительное повышение содержания на 3-и, 7-е и 30-е сутки (рис. 2). В печени наблюдалась более сложная картина. У высокоустойчивых животных на 3-и сутки тренировки уровень PIP составил 8,2 мкгР/г ткани (p<0,02), в контрольной группе – 6,4 мкгР/г ткани (p<0,02), а PIP2 – 8,0 мкгР/г ткани, в контроле – 6,2 мкгР/г ткани (p<0,05). На 7-е сутки содержание полифосфоинозитидов у высокоустойчивых крыс было несколько выше по сравнению с низкоустойчивыми.

К 30-м суткам уровень PIP составил 8,1 и 9,1 мкгР/г ткани, в контроле – 6,4 и 7,4 мкгР/г ткани ($p < 0,05$ и $p < 0,05$) у высоко- и низкоустойчивых животных соответственно. У высокоустойчивых крыс содержание PIP2 повысилось до 8,1 мкгР/г ткани ($p < 0,02$). В низкоустойчивой группе не наблюдалось значительных изменений в содержании PIP2 во все сроки трениров-

ки, что свидетельствует о более существенных сдвигах фосфоинозитидного ответа у высокоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 3). Вероятно, эти различия в модуляции уровней предшественников вторичных мессенджеров сказываются на формировании эффектного ответа клеток, на клеточных приспособительных возможностях.

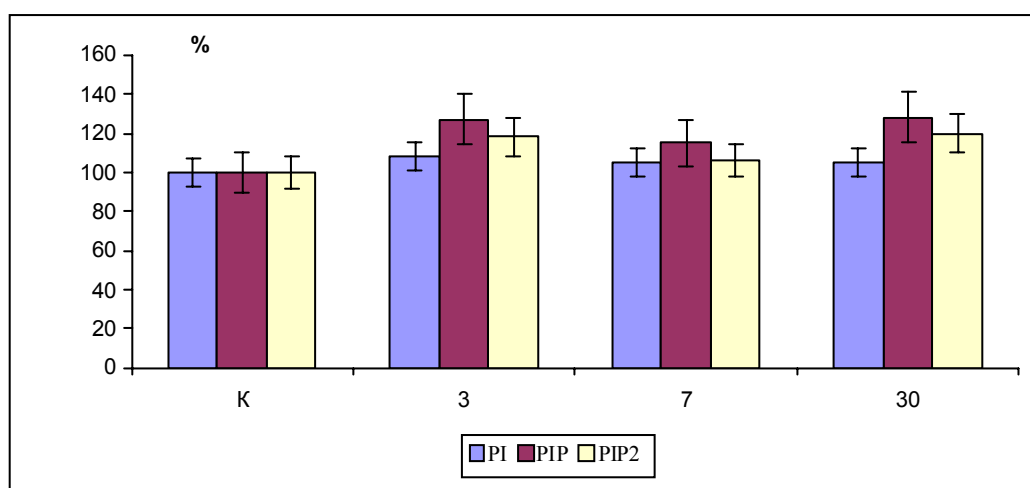


Рис. 2. Содержание фосфоинозитидов в ткани мозга крыс (высокоустойчивая группа) при экспозиции в барокамере (6000 м над ур. м., 6 ч/сут, 30 дней).

Обозначения: по оси ординат – % от контроля, по оси абсцисс – дни экспозиции, $n=6$.

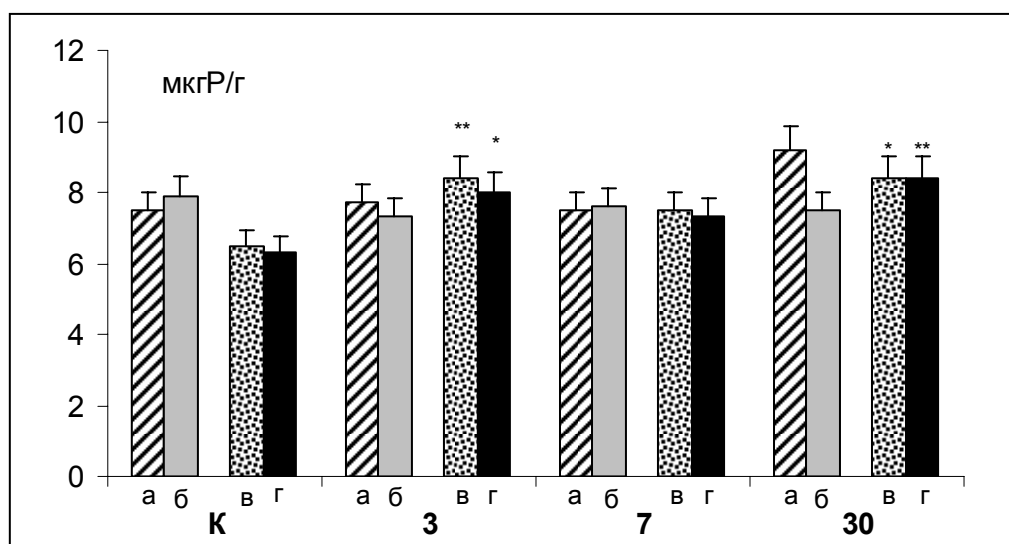


Рис. 3. Содержание полифосфоинозитидов в печени крыс, различающихся по устойчивости к гипоксии при барокамерной тренировке (6000 м над ур. м.; 6 ч/сут, 30 сут).

Обозначения: по оси ординат – микрограммы фосфоинозитидного фосфора на грамм ткани; по оси абсцисс – дни тренировки; а – уровень фосфатидилинозитол-4-фосфата (PIP) у низкоустойчивых крыс, б – уровень фосфатидилинозитол-4,5-фосфата (PIP₂) у низкоустойчивых крыс, в и г – аналогичные показатели у высокоустойчивых крыс; $n=6$; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,02$.

Морфологические особенности. При изучении сосудистых и тканевых реакций головного мозга крыс и изменений в супраоптико-нейрогипофизарной системе обнаружены расстройства в мозговом кровообращении во всех сериях опытов независимо от длительности экспозиции в барокамере, увеличение массы гипофиза у низкоустойчивых крыс в ранние сроки, а у высокоустойчивых – на 30-е сутки. У высокоустойчивых животных с первых дней тренировки относительное содержание нейросекреторного вещества в нейрогипофизе нарастает, но к 30-м суткам его содержание в обеих группах снижается до 0,5–1,0 балла, в контроле – до 2–3 баллов. Наблюдалось изменение формулы популяций нейронов в супраоптическом ядре. Наряду с активно выводящими нейросекрет нейронами 1a типа появляются нейроны 1b типа с умеренным темпом выведения, перинуклеарной локализацией. Секретообразование и секретовыведение в супраоптико-нейрогипофизарной системе в первые дни тренировки сменяется «истощением» на 30-е сутки; вероятно, происходит переход на другой режим функционирования. Кариометрия ядер и ядрышек нейронов супраоптического ядра косвенно свидетельствовала об увеличении содержания РНК нейронов и элементов глии. Для низкоустойчивой группы крыс наблюдалось выраженное увеличение объема ядер и ядрышек, в обеих группах отмечены кистоподобные полости, наполненные большим количеством лейкоцитов, без окрашенного нейросекрета, что может быть следствием дегенерации терминалей аксонов.

Гипоксия, судя по морфологическим и гистохимическим изменениям в мозгу подопытных животных, является мощным стрессорирующим агентом. Анализ данных кариометрии, по которым можно судить об интенсивности процессов транскрипции и трансляции, показал, что у низкоустойчивых животных к 30-м суткам тренировки процессы приспособительной экспрессии генома носили значительно более глубокий характер, иными словами, организм низкоустойчивых крыс «нуждается» в более радикальных перестройках внутриклеточного метаболизма для обеспечения приспособительного гомеостаза.

Таким образом, изменения в параметрах фосфоинозитидной и супраоптико-нейрогипофизарной систем свидетельствует о многоплановом характере перестроек: нейроэндокринного, клеточного и субклеточного звеньев регуляции. При этом модификации на участке передачи сигнала в клетку в фосфоинозитидной мессенджерной системе заключаются в повышении доли полифосфоинозитидов (сдвиг от PI к poly-PI) в общей мембранной фракции инозитолсодержащих фосфолипидов. Именно poly-PI являются основным источником вторичных мессенджеров. Поэтому количественные изменения содержания poly-PI в мембранах – объективный показатель изменения уровня трансдукции первичного сигнала в условиях длительного воздействия возмущающего фактора [11]. Следовательно, указанные события ведут к переходу на новую ступень регуляции, обусловленную длительным воздействием экстремального фактора.

Полученные данные свидетельствуют о различной стратегии приспособительных модификаций фосфоинозитидных источников мессенджеров у крыс с неодинаковой устойчивостью к гипоксии, что подтверждает известное положение о возможности формирования индивидуальных адаптационных моделей в ответ на идентичное возмущающее действие [5].

1. Агаджанян, Н.А. Актуальные проблемы адаптационной, экологической и восстановительной медицины / Н.А. Агаджанян. – М. : Медика, 2006. – 208 с.

2. Болдырев, А.А. Окислительный стресс и мозг / А.А. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, №4. – С. 21–28.

3. Гринштейн, С.В. Необычное поведение мембранного соматического ангиотензин-превращающего фермента в системе обращенных мицелл / С.В. Гринштейн, А.В. Левашов, О.А. Кост // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 1. – С. 46–54.

4. Ильин, В.А. Роль биологических мембран в механизмах адаптации детей и подростков к условиям среднегорья / В.А. Ильин, А.О. Атыканов, Г.А. Мамбетова. – Бишкек : Илим, 2000. – 103 с.

5. Малкин, В.Б. Индивидуальные проявления дыхательной ритмики / В.Б. Малкин, Е.П. Гора // Успехи физиологических наук. – 1996. – Т. 27, №1. – С. 87–100.

6. Рыскулова, С.Т. Радиационная биология мембран / С.Т. Рыскулова. – М. : Энергоатомиздат, 1986. – 208 с.
7. Терновой, В.А. Изменение состава и структуры липидов в различных тканях и мембранах при адаптации организма к физическим факторам высокогорья : автореф. дис. ... канд. биол. наук / В.А. Терновой. – Новосибирск, 1992. – 25 с.
8. Хабибуллова, З.И. Сравнительный анализ молекулярной структуры эритроцитарных мембран людей, проживающих на разных высотах / З.И. Хабибуллова, А.А. Вишнеvский // Вестн. Кыргызско-Российского славянского университета – 2004. – Т. 4, №5 – С. 39–42.
9. Яковлев, В.М. Молекулярные основы адаптации / В.М. Яковлев, А.А. Вишнеvский. – Бишкек : КНУ, 2003. – 234 с.
10. Изменения в структурах мозгового слоя почек крыс при адаптации к высокогорью / Э.А. Янгальчева и др. // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 1995. – №3. – С. 55–57.
11. Gyton, A. Medical Physiology / A. Gyton. – London ltd., 2004. – 1078 p.
12. Lipid-Protein interactions in human and bobine lens membranes by fourier transform Raman and Infrared spectroscopies / S. Hidetoshi et al. // Experimental. Eye Research. – 1996. – V. 62. – P. 47–53.
13. Kugimiya, T. Effects of drug-induced reduction in oxihemoglobin affinity on survival time of muse in severe. Hypoxic conditions / T. Kugimiya, K. Suwa, Y. Inada // Tohoku J. Exp. Med. – 1984. – Vol. 144. – P. 315–320.
14. Nakamura, T. A highperfomance liquid chromatographic method for the determination of polyphosphoinositides in brain / T. Nakamura, Y. Hatori, K.Yamada // Analutical Biochemisrty. – 1989. – Vol. 179. – P. 127–130.

CHANGES OF MEMBRANES OF ERYTHROCYTES AND SOME MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF THE BRAIN IN THE CONDITIONS OF A HYPOXEMIC HYPOXEMIA IN GROUPS OF RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

Ch.O. Japaralievа, I.P. Muhamedova, A.A. Vishnevskii

Institute of mountains physiology, National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic

The features of thermodynamics characteristics of red blood cells bilayer and phosphoinositides composition of plasmic membrane in groups of rats, with deferent resistance to hypoxia were investigated. Spectral characteristics of red blood cells bilayer suggested about features of phases changes at the low-, middle- and high-resistance to hypoxia rats. Infrared IR-spectral analysis showed, that at the high-resistance to hypoxia rats after 75-days of exposition under high altitude (3200 m), the thermodynamics characteristics more variable and exceed by the amplitude of correspond indicators at the low- and middle-resistance animals.

Measures of cell nuclear showed, that at low-resistance animals to 30-days of training in barochamber, processes of expression of genes was more significant and deep, that suggested that for organism of low-resistance rats it is necessary more radical changes of intracellular metabolism for providing adaptive homeostasis. Different strategy of adaptive modifications of phosphoinositides sources of messengers at the rats with different resistance to hypoxia gave evidence about possibility of formation individual adaptive models in response to identical outrageous influence.

Keywords: individual resistance to hypoxia, RBC membranes, IR-spectral analysis, polyphospho-inositides.