

А.Н. Вётош, В.Б. Косткин, О.А. Алексеева, Д.Э. Коржевский

Роль стресс-белков семейства Hsp70 в изменении характера наркотического действия гипербарического азота под влиянием нарастающего гипоксического стимула

Исследовали двигательную активность и рефлексы позы крыс линии Вистар в ходе компрессии азотом до 4,1 МПа в условиях нормоксии и гипоксии. Установили, что напряжение кислорода в моторной коре мозга животных незначительно меняется при дыхании нормоксической кислородно-азотной газовой смесью на фоне компрессии азотом вплоть до 7,1 МПа. Гипоксия в диапазоне парциальных давлений кислорода 0,012–0,004 МПа увеличивала чувствительность и уменьшала устойчивость крыс к действию повышенного давления азота. Эти процессы имели двухфазный характер. Иммуноцитохимическое исследование динамики содержания стресс-белков семейства Hsp70 в моторной коре мозга крыс показало увеличение в 3,44 раза количества нейронов с высоким содержанием исследуемых молекул после компрессии животных азотом до 4,1 МПа. Экспозиция крыс в условиях 6%-й кислородно-азотной дыхательной смеси увеличивала в 2,2 раза число нейронов моторной коры мозга, содержащих значительное количество стресс-белков семейства Hsp70. Полученные результаты об изменении содержания стресс-белков семейства Hsp70 в клетках мозга на фоне изменённой газовой среды позволяют объяснить новые сведения о влиянии гипоксии на процесс развития наркотического действия азота.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования системных и внутриклеточных механизмов действия повышенного давления азота проводятся более 70 лет [3, 12, 13]. Установлены симптоматика азотного наркоза, нейротропный характер действия этого газа в организме человека и млекопитающих животных, способы коррекции состояния организма в ходе компрессии азотом. Однако клеточные механизмы наркотического действия азота изучены недостаточно [1, 16]. В данном отношении повышенный интерес представляют стресс-белки, выполняющие функцию восстановления нативной структуры внутриклеточных молекулярных агрегатов после завершения стрессового воздействия [9,

15, 23]. Стресс-белки семейства Hsp70 выполняют при гипоксическом стрессовом воздействии основную репаративную функцию [15, 17, 19]. Кроме того, практически отсутствуют данные о системных механизмах сочетанного действия на организм млекопитающих пониженного парциального давления кислорода и повышенного парциального давления азота [3, 10, 14]. В связи с этим целью нашей работы было изучение изменений концентрации стресс-белков семейства Hsp70 в клетках коры мозга крыс на фоне гипоксического воздействия, азотного наркоза и их сочетания.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на взрослых

крысах-самцах линии Вистар. Гипоксическую гипоксию и действие повышенного давления азота воспроизводили в барокамере объёмом 107 л. Парциальное давление кислорода в дыхательной газовой среде (ДГС) изменяли в диапазоне 0,002–0,025 МПа. Парциальное давление диоксида углерода в гермообъёме не превышало 0,00046 МПа. Парциальное давление азота изменяли от 0,08 до 4,08 МПа со скоростью 0,1 МПа/мин. Температуру ДГС в камере поддерживали в пределах 25–32 °С [14]. Двигательную активность и рефлекс позы крыс регистрировали визуально и фиксировали в актограммах [3]. Измерение напряжения кислорода в мозгу крыс выполняли по методике Березовского [12]. Материал для иммуноцитохимического исследования белков семейства Hsp статуса нейронов моторной коры мозга крыс получали сразу же после окончания экспозиции животных в условиях изменённой газовой среды. Головной мозг крыс фиксировали в среде: цинк-формалин-спирт [17]. Окрасивание нейронов производили с

помощью первичных (“Novocastra”, Великобритания) и вторичных (“DACS”, Дания) антител иммунореактивных по отношению к белкам семейства Hsp70, используя рекомендации, приведённые в работе Коржевского и соавт. [8]. Эксперименты выполняли в соответствии с требованиями Хельсинской Декларации о гуманном обращении с животными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Этапы изменения двигательной активности и рефлекс позы крыс в ходе компрессии азотом представлены на рис.1. До начала компрессии азотом животные находились в обычной позе покоя. В течение первых 3–5 мин компрессии отмечалось усиление двигательной активности, которую мы интерпретировали как “реакцию на новизну” обстановки внутри барокамеры (шум газовой струи, повышение плотности и температуры ДГС).

Первые двигательные признаки наркотического действия азота проявлялись под

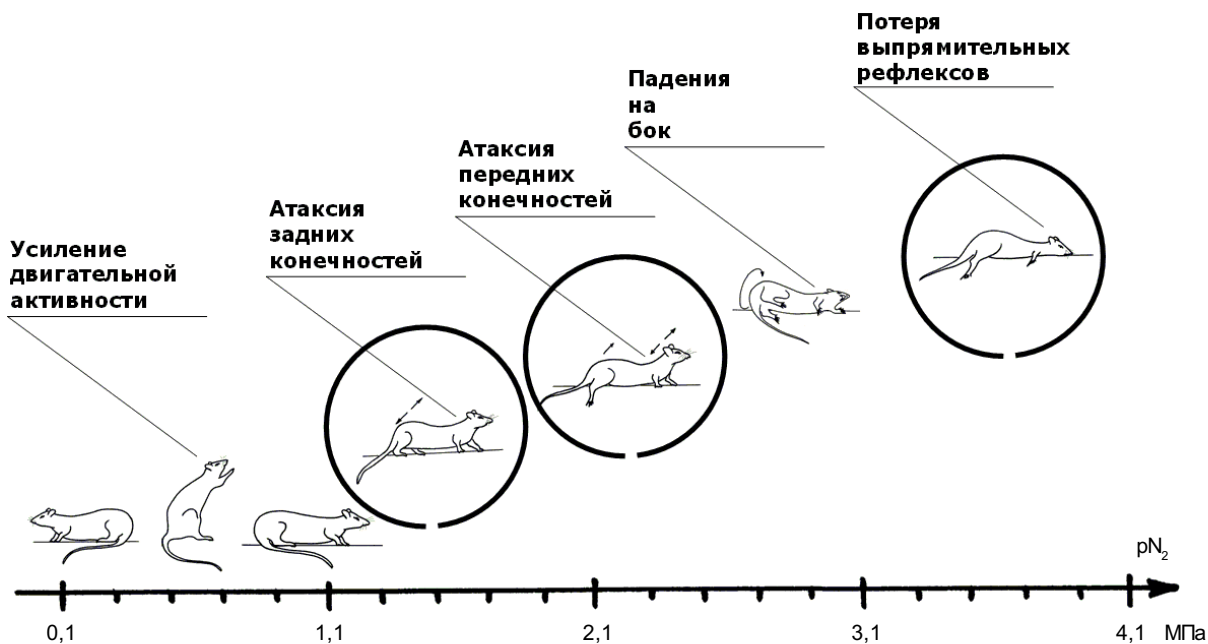


Рис. 1. Изменения двигательной активности и рефлекс позы крыс в ходе развития азотного наркоза. По горизонтальной оси – давление азота в барокамере. Окружностями помечены основные признаки наркотического действия азота

давлением 1,7 МПа в виде атаксии задних конечностей животных при перемещениях по барокамере. По достижении давления 2,6 МПа появлялись признаки атаксии передних конечностей. Под давлением 4,1 МПа наблюдалась потеря выпрямительных рефлексов. Повышение плотности ДГС в ходе компрессии азотом даёт основание предполагать, что в ходе развития азотного наркоза может нарушаться снабжение организма кислородом. Мы проверили это предположение, проведя измерения напряжения кислорода в коре мозга крыс в ходе компрессии азотом вплоть до 11,6 МПа. Результаты этих опытов представлены на рис. 2. В ходе компрессии азотом при содержании кислорода в ДГС 0,02–0,025 МПа напряжение этого газа в коре мозга животных не менялось вплоть до 7,1 МПа. Дальнейшее повышение плотности ДГС, как и ожидалось, приводило к ухудшению снабжения организма кислородом. Однако в выбранном нами для дальнейших иссле-

дований диапазоне давлений азота 0,1–4,1 МПа кислородоснабжение мозга оставалось в пределах нормы.

Двигательная активность и рефлексы позы крыс по мере уменьшения парциального давления кислорода в ДГС со скоростью 1%/мин представлены на рис. 3. Поведенческий характер животных в условиях нарастающей гипоксии выглядит беднее, чем двигательные изменения в ходе компрессии азотом (см. рис. 1). При уменьшении концентрации кислорода в ДГС с 21 до 9 % крысы сохраняли обычную позу покоя. В диапазоне концентраций кислорода 9–7 % отмечалось усиление двигательной активности животных, ниже 7 % – развивалась потеря выпрямительных рефлексов. Это был единственный общий основной признак, объединяющий кислородное голодание и азотный наркоз – терминальная стадия (см. рис. 1, 3). Подобное несовпадение поведенческих характеров позволило провести исследование

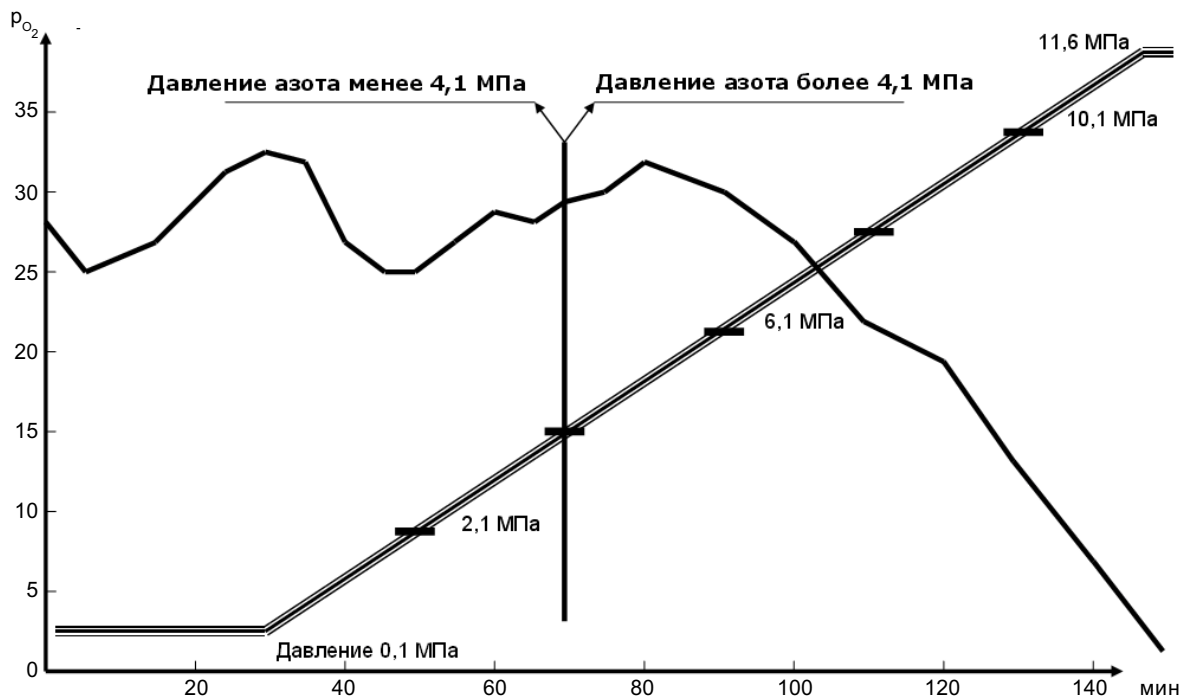


Рис. 2. Динамика напряжения кислорода в моторной коре мозга крыс по мере увеличения давления азота. По вертикальной оси – напряжение кислорода в мозгу, по горизонтальной оси – время эксперимента. Двойная линия – барограмма

азотного наркоза на фоне нарастающего гипоксического стимула, согласно результатам об изменениях двигательной активности и рефлексов позы.

Исследование процесса развития азотного наркоза на фоне гипоксии производилось при концентрациях кислорода в ДГС, равных 21, 12, 8, 6 и 4 %. В качестве основных поведенческих признаков наркотического действия азота использовались: атаксия задних и передних конечностей, и потеря выпрямительных рефлексов (см. рис. 1). Результаты исследования представлены на рис. 4. В условиях нормоксии основные признаки наркотического действия азота впервые проявлялись при давлениях 1,7 МПа (атаксия задних конечностей), 2,6 МПа (атаксия передних конечностей) и 4,1 МПа (потеря выпрямительных рефлексов). Появление самого раннего признака азотного наркоза – атаксии задних конечностей при давлении азота 1,7 МПа мы рассматривали как количественную меру чувствительности организма крыс к наркотическому действию азота. Разницу значений давления

азота между появлением самого раннего и самого позднего признаков азотного наркоза мы рассматривали как количественную меру устойчивости к наркотическому действию азота. В условиях нормоксии она составляла 2,4 МПа. При умеренной, компенсируемой гипоксии (12 и 8 % кислорода в ДГС) все основные поведенческие признаки впервые проявлялись при меньшем давлении. При этом повышалась чувствительность и уменьшалась устойчивость животных к действию гипербарического азота.

В условиях жёсткой, некомпенсируемой гипоксии (6 и 4 % кислорода в ДГС) её влияние на процесс развития азотного наркоза усиливалось. Более быстрыми темпами росла чувствительность и падала устойчивость крыс к наркотическому действию азота. При концентрации кислорода 4 % в ДГС весь спектр поведенческого характера укладывался в диапазон давлений азота 1,1 Мпа, в условиях нормоксии в этом диапазоне отсутствовал любой, даже самый ранний признак азотного наркоза.

Таким образом, результаты, приведённые на рис. 4 убедительно свидетельству-

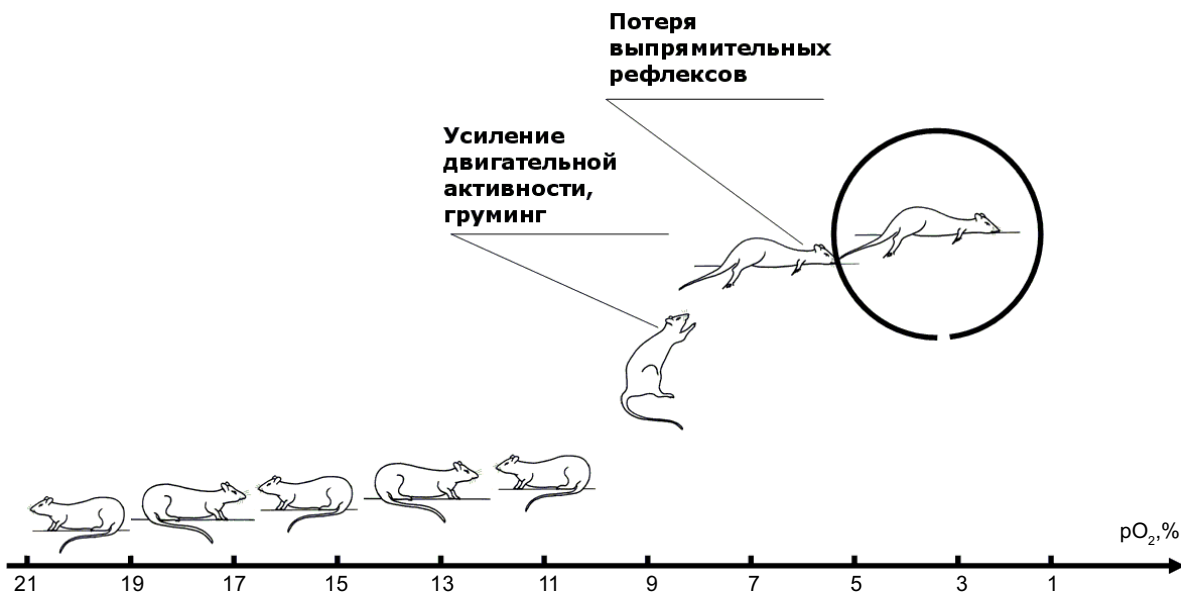


Рис. 3. Изменения двигательной активности и рефлексов позы крыс в ходе развития гипоксии. По горизонтальной оси – концентрация кислорода в барокамере. Окружностью помечен основной поведенческий признак гипоксического состояния животных

ют о том, что процесс развития азотного наркоза является кислородозависимым в диапазоне концентраций кислорода в ДГС 0,021–0,004 МПа. При этом двухфазно увеличивалась чувствительность и уменьшалась устойчивость организма млекопитающих к наркотическому действию азота.

Влияние повышенного давления азота, как и гипоксическое воздействие бесспорно являются стрессующими факторами на организм в целом и его отдельные клетки в частности. Не вызывает сомнения нейротропный характер наркотического действия азота и гипоксии. В связи с этим мы исследовали динамику концентрации стресс-белков семейства Hsp70 в нейронах моторной коры мозга крыс, испытавших действие повышенного давления азота и дефицита кислорода (таблица).

У интактных животных, содержащихся до опыта в стандартных условиях вивария, около 40 % нейронов моторной коры мозга

имели в цитоплазме существенное количество белков семейства Hsp70. При этом число нейронов, цитоплазма которых была насыщена значительным количеством стресс-белков, составляло 2,5 %.

Сеанс гипербарического азотного воздействия увеличивал количество нейронов с высоким содержанием белков Hsp70 в 3,44 раза. Гипоксия, в свою очередь, увеличивала число Hsp-активных нейронов в 2,2 раза, а также умеренно Hsp-активных нейронов – с 37 до 51,1 %. Следует отметить, что иммуоцитохимическая реакция на стресс-белки семейства Hsp70 проявлялась преимущественно в цитоплазме и лишь в небольшой степени в ядрах клеток. Полученные результаты указывают на усиление роли стресс-белков семейства Hsp70 в восстановлении повреждённых клеточных молекулярных агрегатов при гипербарическом азотном воздействии и кислородном голодании.

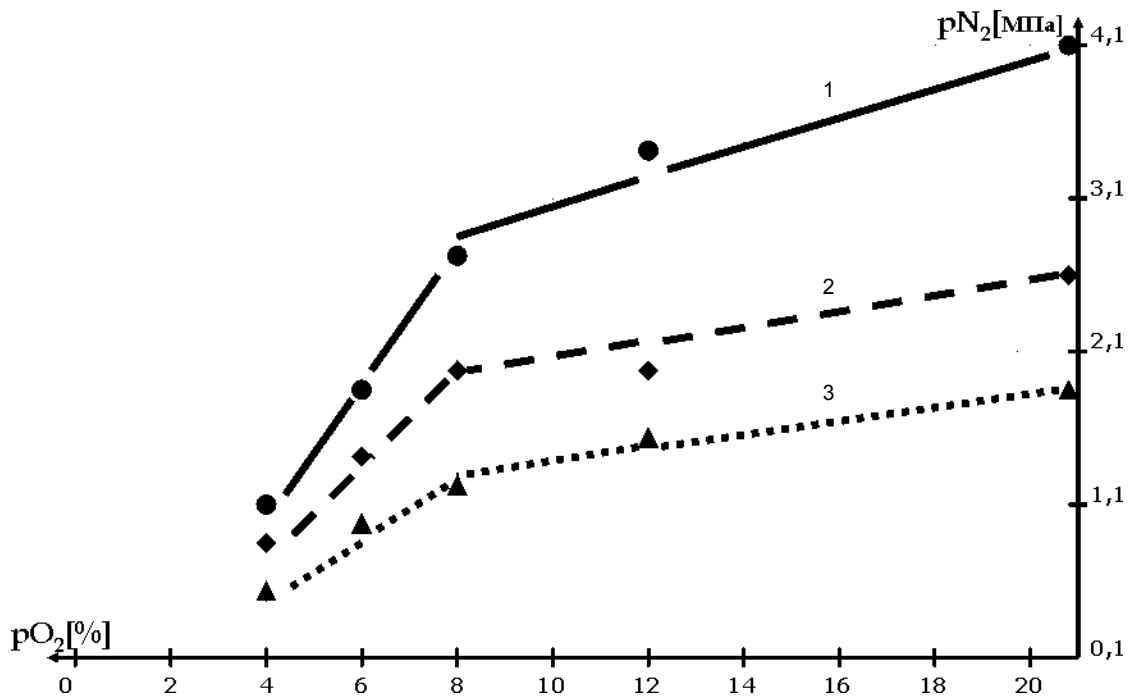


Рис. 4. Изменения двигательной активности и рефлексов позы крыс в ходе развития азотного наркоза на фоне нарастающего гипоксического стимула. По горизонтальной оси – концентрация кислорода в дыхательной газовой смеси, по вертикальной оси – парциальное давление азота: 1 – потеря выпрямительных рефлексов, 2 – атаксия передних конечностей, 3 – атаксия задних конечностей

Содержание стресс-белков семейства Hsp70 в нейронах коры мозга крыс (% общего числа исследованных нейронов)

Условия исследования	Значительное количество	Умеренное количество	Незначительное количество
Контроль	2,5	37	60,5
Азотный наркоз	8,6	39,3	52,1
Гипоксия (6 % O ₂)	5,5	51,1	43,4

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что наркотическое действие азота усиливается в гипоксических условиях. При этом значительно увеличивается пул нейронов моторной коры мозга крыс, содержащих большое количество стресс-белков семейства Hsp70. Рассмотрим вероятные клеточные механизмы, которые можно положить в основу объяснения полученных новых результатов и построения тактики дальнейшего научного поиска.

На рис. 5 представлена схема, объясняющая роль стресс-белков в восстановлении нативной структуры внутриклеточных молекулярных агрегатов [3, 9, 20, 22].

В ходе рутинного функционирования клетки возникают периоды повышения метаболической нагрузки и кратковре-

менного нарушения баланса между возросшей потребностью в кислороде и поступлением молекул этого газа. Данные коллизии чаще происходят в активно работающих клетках, например в нейронах и кардиомиоцитах. В подобных случаях развиваются кратковременные периоды оксидативного стресса, которые приводят к увеличению концентрации активных форм кислорода в митохондриях и пероксисомах [11]. Одна из активных форм кислорода супероксидный анион-радикал, вступая в реакцию с молекулами оксида азота, порождает высокореакционноспособную молекулу пероксинитрита [15, 17]. Этот продукт метаболизма повреждает S-S-связи в молекулах окрестных белков, тем самым, нарушая их нативную конформационную структуру [6]. Постоянно присутствующие в активно работающих

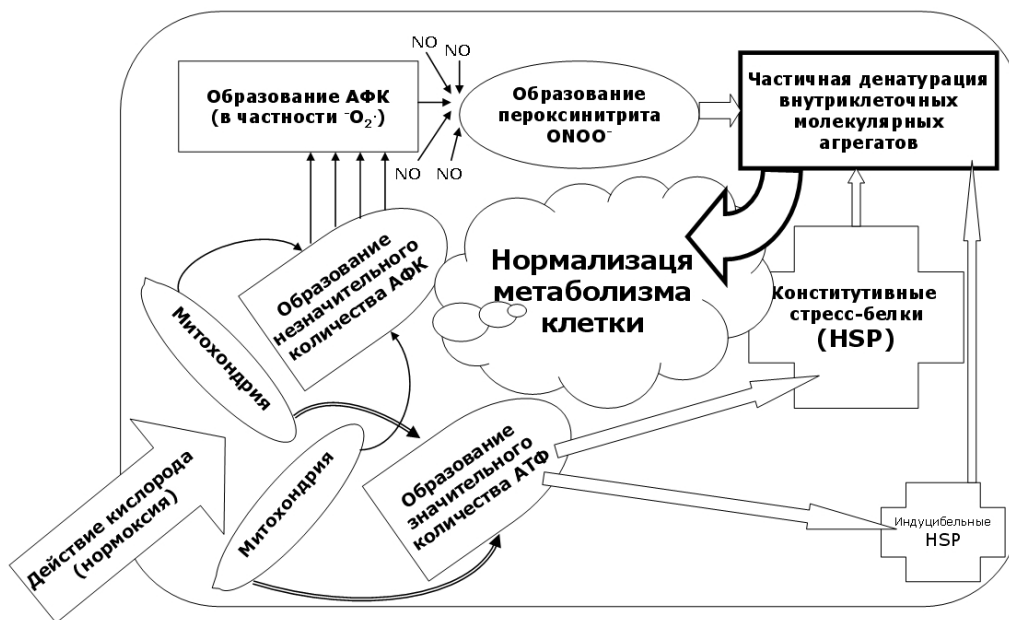


Рис. 5. Внутриклеточная система повреждения и репарации молекулярных агрегатов

клетках конститутивные стресс-белки способны быстро восстановить исходную конформацию повреждённых клеточных молекулярных агрегатов [3, 9, 15, 23]. В случае недостаточности репарационной потенции конститутивных стресс-белков, клетка способна быстро синтезировать дополнительные индуцибельные Hsp [9, 20]. Репарационная активность стресс-белков требует затраты энергии молекул АТФ [15, 18].

В ходе компрессии азотом количество пероксинитрита в клетках увеличивается [21]. Следовательно, усиливается интенсивность повреждения белков и возрастает репарационный ответ активно работающих клеток (см. таблицу).

В условиях гипоксии количество активных форм кислорода в клетках возрастает [11, 15]. Это также приводит к увеличению концентрации пероксинитрита и увеличению количества частично повреждённых белков [6, 15, 17]. Однако процессы репарации в гипоксических условиях затруднены, так как при недостатке кислорода уменьшается синтез АТФ [5, 15]. Такое объяснение хорошо согласуется с нашими результатами (см. рис. 3, таблицу).

И, наконец, в условиях сочетанного действия повышенного давления азота и гипоксии количество молекул пероксинитрита должно возрастать суммативно. В то же время на фоне гипоксии в клетках уменьшается содержание АТФ и, следовательно, понижается репаративный потенциал конститутивных стресс-белков. Совокупность этих двух обстоятельств, которые усугубляют при гипоксии развитие азотного наркоза, должна вызывать увеличение чувствительности организма крыс к действию повышенного давления азота и уменьшение устойчивости животных к влиянию этого газа под давлением (см. рис. 4).

Таким образом, выявленное нами усугубление процесса азотного наркоза в условиях гипоксии может быть объяснено

вовлечением в механизмы наркотического действия азота, развития гипоксии и их сочетания изменяет содержание стресс-белков семейства Hsp70.

**A.N.Vetosh, V.B.Kostkin, O.S.Alekseeva,
D.E.Korjevsky**

HSP70 INFLUENCE ON DEVELOPMENT OF NITROGEN NARCOSIS UNDER LOW OXYGEN PRESSURE

The spontaneous motor activity and pose reflexes of male adult rats (Wistar) were observed in the course of high pressure nitrogen compression up to 4,1 MPa. The experiments were carried out under normoxic and hypoxic conditions. Stable rat motor cortex oxygen tension was recording during the nitrogen compression up to 7,1 MPa under normoxic condition. Sensitivity to nitrogen high pressure to be on the increase under hypoxic conditions. In its turn, resistibility to nitrogen high pressure to be on the decrease under hypoxic conditions (oxygen partial pressure from 0,012 to 0,004 MPa). Quantity of high density heat shock proteins (Hsp70) rats motor cortex neurons was 3,44 times higher after course of high pressure nitrogen compression up to 4,1 MPa. For hypoxic exposure (6% O₂) the difference was less pronounced – 2,2 times. Data about rat motor cortex neurons Hsp70 concentration under high nitrogen pressure and low oxygen pressure may turn to be a clear base for explanation hypoxic influence on processes of nitrogen narcosis.

I.M.Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St.Peterburg, Russia;

Institute of Experimental Medicine, RAMS, St. Peterburg, Russia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беннетт П., Еллиотт Д. Медицинские проблемы подводных погружений. – М.: Медицина, 1988. – С.247–273.
2. Березовский В. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – К.: Наук. думка, 1975. – 250 с.
3. Вётош А. Биологическое действие азота. – СПб, 2003. – 231 с.
4. Вётош А., Алексеева О. Развитие гипотермии под действием повышенного давления азота // Докл. Академии наук. – 1997. – **355**, №2. – С. 276–278.
5. Дудченко А., Белоусова В., Лукьянова Л. Влияние различных концентраций кислорода на содержание АТФ в изолированных гепатоцитах адаптированных и неадаптированных к гипоксии крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1994. – **118**, № 12. – С. 1268–1272.

6. Зенков Н., Меньщикова Е., Вольский Н., Козлов В. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи совр. биологии. – 1999, **119**. – №5. – С. 440–450.
7. Коржевский Д., Григорьев И., Отеллин В. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрофизиологических исследованиях // Морфология. – 2006. – **129**, №1. – С. 85–86.
8. Коржевский Д., Гиляров А. Оптимизация метода иммуноцитохимического выявления нестина на парафиновых срезах головного мозга крыс // Там же. – 2006. – **130**, №6. – С. 78–80.
9. Меерсон Ф., Малышев И. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца. – М.: Наука, 1993. – 158 с.
10. Нессирио Б. ред. Единые правила безопасности труда на водолазных работах. Часть II. Медицинское обеспечение водолазов. – М.: Мортехинформреклама, 1992. – С. 143–145.
11. Саприн А., Калинина Е. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биол. химии. – 1999. – **39**. – С. 289–326.
12. Behnke A., Thomson R., Motley E. The psychologic effects from breathing air at 4 atmospheres pressure // Amer. J. Physiol. – 1935. – **112**. – №3. – P. 554–558.
13. Bennett P. The aetiology of compressed air intoxication and inert gas narcosis. – Oxford: Pergamon Press, 1966. – 109 p.
14. Bennett P. The physiology of nitrogen narcosis and the high pressure nervous syndrome. – In: Diving medicine / Ed. Strauss R., New York: Grune and Stratton, 1976. – P. 157–180.
15. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. – 1999. – **79**, № 4. – P. 1431–1568.
16. Macdonald A. ed. Effects of High Pressure on Biological Systems. – Berlin: Springer-Verlag, 1993. – 239 p.
17. Malyshev I., Zenina T., Golubeva L. et al. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia // Nitric oxide. – 1999. – **3**, №2. – P. 105–113.
18. Morimoto R., Nollen E. The Heat-Shock response: Sensing the Stress of Misfolded Proteins. – In: Handbook of Cell Signaling. – New York: Elsevier Science, 2004. – Vol. 3. – P. 269–275.
19. Murphy S., Song D., Welsh F. et al. Regional expression of heat shock protein 72 mRNA following mild and severe hypoxia in neonatal piglet brain // Adv.Exp.Med.Biol. – 1999. – **471**. – P. 155–163.
20. Sharp F., Massa S., Swanson R. Heat-shock protein protection // Trends Neurosci. – 1999. – **22**. – №3. – P. 97–99.
21. Thom S., Fisher D. Enhancement of peroxynitrite-mediated nitration reactions by compressed gases. – In: High pressure biology and medicine / Eds. Bennett P., Demchenko I., Marquis R. – Rochester Press, 1998. – P. 16–21.
22. Valdez L., Alvarez S., Arnaiz S. et al. Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix // Free Radical Biol. and Med. – 2000. – **29**. – №3–4. – P. 349–356.
23. Welch W. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease // Physiol. Rev. – 1992. – **72**, №4. – P. 1063–1081.

*Ин-т эволюц. физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия;
Ин-т эксперим. медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: vjotnn@yahoo.ru*