

УДК 612.59

Е. Я. Ткаченко, С. В. Ломакина, Т. В. Козырева

## РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ХОЛОДОЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Исследовалось влияние ионофоретического введения кальция в кожу, где сосредоточены холодовые рецепторы, на формирование холодозащитных реакций при разных скоростях охлаждения, а также при повторных холодовых воздействиях. Показано, что введение ионов кальция снижает порог возникновения сосудистой реакции при всех типах холодовых воздействий. В инициации метаболической реакции на холоде играет роль присутствие динамической компоненты терморецепторной активности, способствующей более резкому и значительному нарастанию норадреналина в крови. Предполагается, что модулирующее влияние ионов кальция на пороги терморегуляторных реакций опосредовано влиянием кальция на образование и выброс норадреналина.

**Ключевые слова:** терморегуляция, холод, кальций

Передача сигнала в клетках млекопитающих сопровождается током ионов кальция через плазматическую мембрану и освобождением кальция из эндо- или саркоплазматического ретикула. В результате увеличения кальция в цитозоле инициируются или изменяются клеточные реакции, которые обслуживают физиологические процессы в тканях, органах и на уровне целого организма [8, 16]. При активации холодовых рецепторов происходит увеличение внутриклеточного уровня ионов кальция [15], а изменение содержания внеклеточного кальция определяет температурную чувствительность ионных каналов клеточных мембран [17]. Повышение концентрации ионов кальция в крови оказывает влияние на работу температурного анализатора человека, увеличивая его чувствительность к холоду [3]. Изменения работы холодовых афферентов через модуляцию регуляторных характеристик терморегуляторной системы могут существенно влиять на параметры холодозащитных реакций. Это послужило предпосылкой для проведенного нами исследования влияния ионофоретического введения кальция на формирование холодозащитных реакций при разной скорости охлаждения, а также влияния предшествующего охлаждения на пороги терморегуляторных реакций после ионофореза кальция.

**Методика.** В опытах использованы белые крысы-самцы линии Вистар весом 200–250 г., наркотизированные внутрибрюшинным введением нембутала в дозе 40 мг/кг. Температура воздуха в помещении поддерживалась около 22°C. Животное располагалось на столике с термодом площадью 25 кв.мм. Исходно с помощью термода поддерживалась температура кожи живота около 37°C.

В различных группах животных использовались разные режимы охлаждения: быстрое охлаждение – скорость изменения температуры кожи

0,08°C/с – сопровождается, судя по литературным данным, динамической реакцией холодовых рецепторов; медленное охлаждение (скорость 0,008°C/с), при котором динамическая компонента активности рецепторов отсутствует [10]. В опытных группах (рис.1) перед охлаждением (быстрым

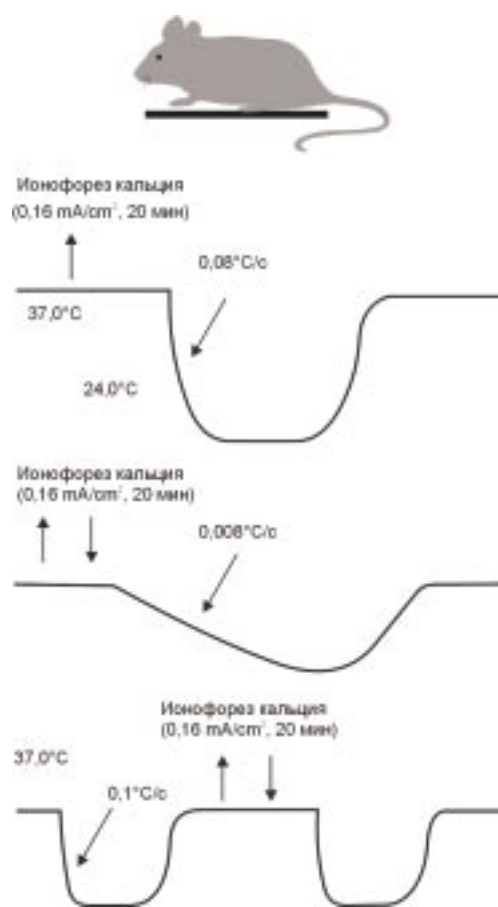


Рис. 1. Схема эксперимента с введением кальция

или медленным) проводился ионофорез 10% раствором хлористого кальция на кожу охлаждаемой поверхности живота силой тока 2мА в течение 20 минут при площади электрода 25 кв.мм. В отдельной серии опытов ионофорез кальция проводился между первым и повторным быстрым охлаждением (рис. 1). Контролем к каждой группе животных служили опыты с соответствующим типом холодовых воздействий без ионофореза кальция. Во всех случаях, с ионофорезом кальция и без него, глубина охлаждения была одинаковой, до снижения ректальной температуры на 3°C.

Во время экспериментов проводилась непрерывная регистрация ряда терморегуляторных параметров: скорость и сила охлаждения оценивались по внутрикожной температуре участка, контактирующего с термодом; ректальная температура характеризовала температуру ядра тела; по температуре изолированного от окружающей среды участка кожи уха судили о направленности и величине сосудистой реакции кожи; метаболическая реакция на холод оценивалась по общему потреблению кислорода; о сократительном термогенезе судили по величине электрической активности мышц шеи. За пороги терморегуляторных реакций принято снижение во время охлаждения температуры кожи уха на 0,1°C, повышение потребления кислорода на 1 мл/мин кг, прирост электрической активности мышц шеи на 1 мкВ. За максимальную величину реакции приняты величины параметров в конце охлаждения.

Всего в экспериментах использовано 62 животных. Данные непрерывной регистрации опытов обработаны с применением специально разработанной в лаборатории компьютерной программы "Терм" и t-критерия Стьюдента.

**Результаты.** При термонеutralной температуре среды и температуре кожи живота  $37,4 \pm 0,10^\circ\text{C}$  ионофорез кальция не оказывал влияние на величину регистрируемых показателей как перед первым, так и перед повторным охлаждением (табл.).

Охлаждение животных сопровождалось термозащитными реакциями организма, направленными на ограничение теплоотдачи и усиление теплопродукции.

**Сосудистая реакция.** При быстром охлаждении после ионофореза кальция сосудистая реакция наступала раньше, чем без предварительного введения кальция (латентный период реакции  $35,9 \pm 2,12$  и  $56,5 \pm 7,92$  с соответственно;  $p < 0,05$ ), при меньшем пороговом снижении температуры кожи живота (рис. 2А). Ионофорез кальция приводил к увеличению максимальной величины сосудистой реакции на 38% (рис. 2Б). Ректальная температура на момент возникновения сосудистой реакции не изменялась как без ионофореза кальция, так и после него.

При медленном охлаждении направленность изменений параметров сосудистой реакции под влиянием кальция была такой же, как и при быстром охлаждении: наблюдалось значительное укорочение латентного периода реакции ( $84,3 \pm 13,1$  с против  $370 \pm 43,1$  с у контрольных животных;  $p < 0,05$ ), уменьшение температурного порога (рис. 2А) и усиление реакции почти на 35% (рис. 2Б).

При повторном быстром охлаждении без ионофореза кальция наблюдалось значительное увеличение температурного порога сосудистой реакции, по сравнению с порогом при первом охлаждении (рис. 2А). Эти результаты подтверждают наши предыдущие [12] и литературные [9] данные, показавшие, что уже однократное холодовое воздействие приводит к увеличению порогов терморегуляторных реакций в ответ на повторное охлаждение. Ионофоретическое введение кальция перед повторным охлаждением отменяло следовое влияние предшествующего охлаждения, уменьшая пороги холодозащитных реакций. В то же время ионофорез кальция не влиял на максимальную величину сосудистой реакции при повторном охлаждении (рис. 2Б).

**Метаболическая реакция.** Метаболическая реакция при быстром охлаждении после ионофореза кальция также наступала в более ранние сроки (ла-

Таблица

**Влияние ионофореза кальция на показатели в термонеutralных условиях ( $M \pm m$ )**

Параметры	Первое охлаждение		Повторное охлаждение	
	до ионофореза кальция	после ионофореза кальция	до ионофореза кальция	после ионофореза кальция
Потребление кислорода	$18,3 \pm 0,58$	$17,2 \pm 0,64$	$19,0 \pm 0,72$	$19,4 \pm 0,49$
Температура уха, °C	$30,0 \pm 0,40$	$31,0 \pm 0,31$	$30,3 \pm 0,50$	$29,9 \pm 1,45$
Температура живота, °C	$37,4 \pm 0,10$	$36,7 \pm 0,35$	$37,0 \pm 0,19$	$37,0 \pm 0,10$
Ректальная температура, °C	$36,3 \pm 0,11$	$36,5 \pm 0,14$	$36,5 \pm 0,10$	$36,3 \pm 0,19$
ЭМГ	$2,3 \pm 0,14$	$2,7 \pm 0,26$	$2,4 \pm 0,13$	$2,2 \pm 0,27$

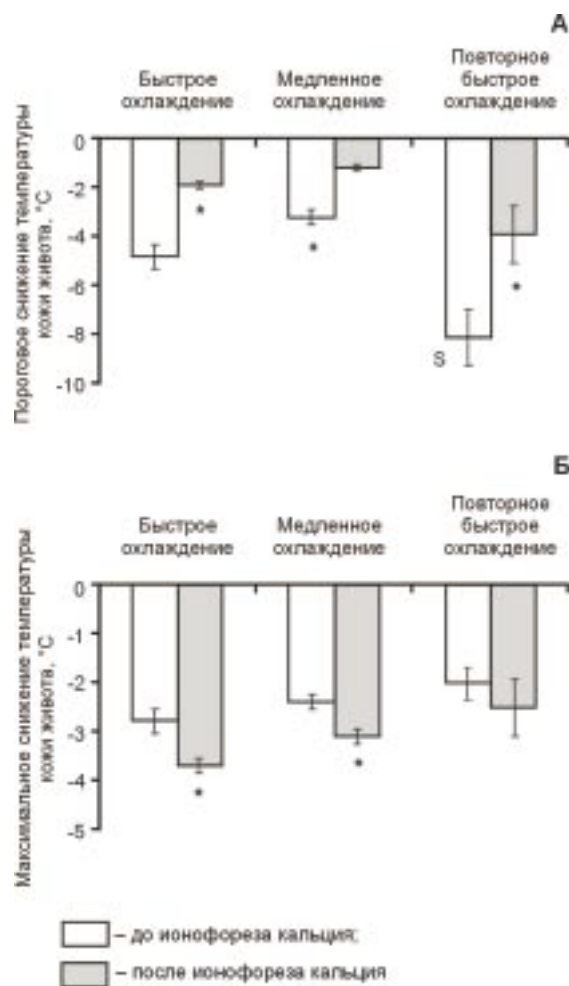


Рис. 2. Пороги (А) и максимальные величины (Б) сосудистой реакции при быстром, медленном и повторном быстром охлаждении до и после ионофореза кальция.

\* – ионофорез кальция по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ; S – повторное быстрое охлаждение по сравнению с быстрым охлаждением,  $p < 0,05$

тентный период  $234 \pm 38,4$  против  $407 \pm 56,5$  с) и при существенном снижении порогов кожной (рис. 3А) и ректальной (рис. 3Б) температур, по сравнению с метаболической реакцией без предварительного введения кальция.

При медленном охлаждении после воздействия ионов кальция температурные пороги метаболической реакции достоверно не отличались у контрольных и опытных крыс (рис. 3).

Повторное охлаждение, как и в наших предыдущих исследованиях [12], приводило к увеличению порогов метаболической реакции для кожной и ректальной температур, по сравнению с порогом при первом охлаждении. Ионофоретическое введение кальция возвращало пороговые значения к уровню, наблюдаемому при первом охлаждении (рис. 3). В то же время ионофорез кальция не оказал существенного влияния на величину

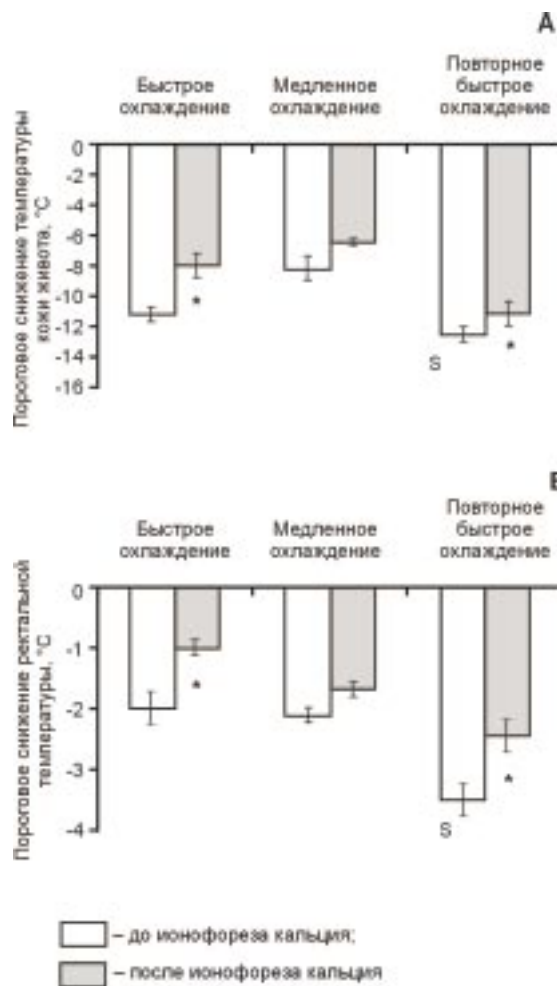


Рис. 3. Пороги метаболической реакции для кожной (А) и ректальной (Б) температур при быстром, медленном и повторном быстром охлаждении до и после ионофореза кальция.

\* – ионофорез кальция по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ; S – повторное быстрое охлаждение по сравнению с быстрым охлаждением,  $p < 0,05$

максимального прироста потребления кислорода при всех типах охлаждения (рис. 4А).

**Электрическая активность мышц.** При быстром охлаждении после ионофореза кальция пороговое увеличение электрической активности мышц шеи возникало раньше, чем без введения кальция (латентный период равен  $3354 \pm 0,2$  и  $478 \pm 29,3$  с соответственно). Температурные пороги под влиянием ионофореза кальция оказались достоверно снижены (для температуры кожи живота:  $10,2 \pm 0,76$  и  $8,00,40^\circ\text{C}$ ; для ректальной температуры:  $2,2 \pm 0,27$  и  $1,29 \pm 0,25^\circ\text{C}$ ). При этом температурные пороги дрожжи значимо не отличались от таковых для повышения потребления кислорода, тогда как максимальная величина дрожжи при быстром охлаждении после воздействия кальция была выше, чем у крыс, не подвергавшихся ионофорезу (рис. 4Б).

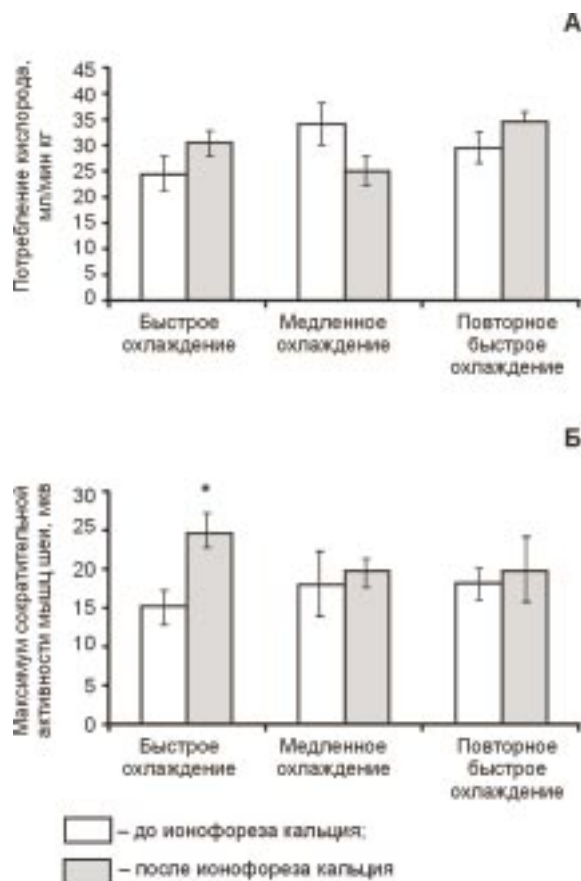


Рис. 4. Максимальный прирост потребления кислорода (А) и сократительной активности мышц шеи (Б) при быстром, медленном и повторном быстром охлаждении до и после ионофореза кальция.

\* — ионофорез кальция по сравнению с контролем,  $p < 0,05$

При медленном и повторном охлаждении достоверных изменений порогов возникновения дрожи под влиянием ионофореза кальция не отмечалось, хотя тенденция к ускорению возникновения реакции сохранялась.

Следует отметить, что в условиях довольно глубокого наркоза метаболическая и сократительная реакции при всех типах охлаждения возникали не у всех животных, несмотря на значительное снижение ректальной температуры. Однако, если без ионофореза кальция метаболическая и сократительная реакции при быстром охлаждении возникали в 40% случаев (10 из 25), то после ионофореза — в 77% (7 из 9).

**Результаты.** Из представленных данных следует, что увеличение концентрации ионов кальция в коже охлаждаемой поверхности, где сосредоточены холодовые рецепторы, приводит к изменению порогов холодозащитных реакций. Во время быстрого охлаждения, когда присутствует динамическая компонента активности кожных рецепторов, после введения кальция сосудистая, метаболическая реакции и усиление электрической активности мышц возникали раньше при меньшем пороговом снижении температур. При медленном ох-

лаждении (в отсутствие динамической активности кожных терморецепторов) введение кальция оказывало аналогичное влияние только на параметры сосудистой реакции; пороги метаболической реакции и дрожи до и после введения кальция не отличались. Это указывает на роль динамической активности кожных термоафферентов в развитии метаболической реакции, что, возможно, связано с более ранней активацией выброса норадреналина из симпатических нервных окончаний [13].

Возможным механизмом изменения порогов терморегуляторных реакций может быть модуляция ионами кальция рецепторного входа как прямая, так и опосредованная влиянием норадреналина, в регуляции синтеза и выброса которого кальций тоже принимает участие.

Ионы кальция влияют на рецепторы кожи, смещая температурные характеристики холодовых рецепторов и оказывая влияние на их импульсную активность. Как показали исследования *in vitro*, при изменении концентрации ионов кальция в растворе ток кальция через плазматическую мембрану и активность холодовых рецепторов меняется нелинейно. Снижение концентрации кальция приводит к усилению импульсной активности терморецепторов, тогда как значительное превышение уровня внеклеточного кальция подавляет их активность [1, 18]. Если перенести данные, полученные *in vitro* на целый организм, то такие изменения активности холодовых рецепторов могли бы привести к сдвигам порогов реакций в сторону, противоположную наблюдавшимся в наших экспериментах. Однако в целом организме, наряду с прямым влиянием кальция на активность холодовых рецепторов, могут иметь место влияния кальция, опосредованные через норадренергические механизмы.

В симпатических нервных окончаниях кальций выступает в роли иона регулятора активности ферментов, участвующих в синтезе медиатора, а также инициирует его выброс [19]. Кальций является также модулятором чувствительности клеточных адренорецепторов: повышение концентрации кальция увеличивает чувствительность альфа-адренорецепторов, для которых кальций является вторичным посредником, и снижает чувствительность бета-адренорецепторов за счет угнетения кальцием аденилатциклазы [6].

Ранее нами показано, что увеличение концентрации норадреналина в крови вызывает угнетение высокочастотных и возбуждение низкочастотных периферических холодовых рецепторов [4], а ионофоретическое введение норадреналина в кожу охлаждаемой поверхности приводит к изменению порогов холодозащитных реакций, однонаправленных полученным в настоящем исследовании при ионофоретическом введении кальция [12]. Таким образом, сдвиги порогов терморегуляторных реакций, наблюдаемые в наших экспериментах, могут быть объяснены именно влиянием



кальция на симпатические окончания в коже, что приводит к повышению выброса норадреналина, который, в свою очередь, изменяет афферентный сигнал и вызывает сдвиги порогов терморегуляторных реакций.

Метаболическая реакция на охлаждение в наших экспериментах в значительной степени угнетается наркозом, необходимость которого вызвана, в частности, желанием исключить эмоциональную стрессовую компоненту при холодовом воздействии. После ионофореза кальция охлаждение инициировало метаболическую реакцию в существенно большем числе случаев, чем без воздействия кальция. Известно, что тепло, извлекаемое при гидролизе АТФ  $\text{Ca}(2+)$ -АТФазой, играет значительную роль в терморегуляции и энергетическом балансе клетки [14]. Возможно, что увеличение концентрации внеклеточного кальция увеличивает градиент ионов через мембрану клетки и таким образом повышает теплопродукцию.

Метаболическая реакция на холод, оценка которой проводилась по общему потреблению кислорода животным, складывается из несократительного и сократительного термогенеза; о величине последнего судили по электрической активности мышц шеи, первыми вступающих в реакцию холодовой дрожи. Обращает на себя внимание, что в наших экспериментах увеличение максимальной величины дрожи при быстром охлаждении после ионофореза кальция, не приводило к росту максимальной величины общей метаболической реакции (судя по потреблению кислорода). Усиление дрожи после ионофореза кальция может быть связано с его регуляторным влиянием на сократительный процесс в скелетных мышцах [2]. Увеличение под влиянием ионов кальция чувствительности  $\alpha$ -адренорецепторов также может вести к усилению мышечного термогенеза [11]. В то же время несократительный термогенез может снижаться из-за уменьшения чувствительности  $\beta$ -адренорецепторов вследствие угнетения кальцием аденилатциклазы [19]. В результате этих разнонаправленных процессов (усиления сократительного, но снижения несократительного термогенеза) под влиянием ионов кальция их результирующая – общий метаболизм – остается без изменения.

Введение кальция перед повторным быстрым охлаждением отменяло следовые эффекты предыдущего охлаждения, ведущего к увеличению порогов холодозащитных реакций. Имеются лишь некоторые данные об участии ионов кальция в адаптивных перестройках при длительном воздействии холода. Ранее нами показано, что у адаптированных к холоду людей и животных снижено содержание кальция в крови [5]. Это может быть следствием вызванного холодовой акклиматизацией увеличения входящего тока ионов кальция и последующим возрастанием уровня митохондриального кальция [7]. Описанные адаптивные изме-

нения обмена кальция могут быть также связаны с изменением чувствительности тканей к норадреналину при адаптации к холоду. В свою очередь, ионофоретическое введение норадреналина перед повторным охлаждением, так же как введение кальция, отменяло следовое влияние предварительного охлаждения, снижая пороги холодозащитных реакций [12].

**Заключение.** Таким образом, ионофоретическое введение кальция в кожу охлаждаемой поверхности влияет на порог сосудистой реакции при всех типах охлаждения. В инициации метаболической реакции на холоде играет роль присутствие динамической компоненты терморецепторной активности, способствующей более резкому и значительному нарастанию норадреналина в крови. Можно предположить, что модулирующее влияние ионов кальция на пороги терморегуляторных реакций опосредовано влиянием кальция на образование и выброс норадреналина.

#### EFFECT OF CALCIUM IONS ON THE COLD-DEFENSE RESPONSE FORMATION AT DIFFERENT TYPES OF COOLING

E. Ya. Tkachenko, S.V. Lomakina, T.V. Kozyreva

The changes in cold-defense responses after the iontophoretic calcium ions infusion into skin, where the cold-sensitive thermoafferents are spread, were studied at rapid and slow cooling as well as at the repeated rapid cooling. Calcium ions caused the decrease in the temperature thresholds of heat loss response at all types of cooling. The importance of the dynamic activity of the skin cold receptors was observed at the formation of the metabolic response because the influence of calcium on this response was evident only at rapid cooling when the cold receptor dynamic activity was present, and the noradrenaline release was more expressed. It is suggested, that modulating calcium effect on thermoregulatory responses is mediated by its influence on the sympathetic nerve endings in skin.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арокина Н.К., Жарников А.М. // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 1995. Т. 81. № 12. С. 24–30.
2. Бендолл Дж. Мышцы, молекулы и движение. М., 1970. 256 с.
3. Козырева Т.В. // Физиология человека. 1983. № 4. С. 671–672.
4. Козырева Т.В. // Физиол. журн. СССР. 1983. Т. 69. № 3. С. 367–371.
5. Козырева Т.В., Тихонова А.Я., Ткаченко А.П., Синдировская И.Н. // Физиология человека. 1987. № 1. С. 149–152.
6. Костюк П.Г., Чазов Е.И. // Успехи физиол. наук. 1988. Т. 19. С. 3–11.
7. Barre H., Nedergaard J. // Am. J. Physiol. 1987. Vol. 252, Issue 6. P. 1046–1054.
8. Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. // Nature. 1998. Vol. 395. P. 645–648.
9. Bruck K., Zeisberger E. // Pharmac. Ther. 1987. Vol. 35. P. 163–215.
10. Davies S.N., Goldsmith G.E., Hellon R.F., Mitchell D. // J. Physiol. 1983. Vol. 344. № 1. P. 161–175.

11. Hall J.L., Ye J.M., Clark M.G., Colquhoun E.Q. // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272. Issue 5. P. 2146–2153.
12. Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ya., Kozaruk V.P. // *J. Thermal Biology.* 1999. Vol. 24. P. 175–183.
13. Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ya., Kozaruk V.P., Latysheva T.V., Gilinsky M.A. // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 276. P. 1668–1672.
14. Leopoldo De Meis // *Am J. Physiol. Cell. Physiol.* 1998. Vol. 274. Issue 6. P. 1738–1744.
15. Okazawa M., Takao K., Hori A., Shiraki T., Matsumura K. and Kobayashi S. // *The Journal of Neuroscience.* 2002. Vol. 22(10). P. 3994–4001.
16. Rasmussen H., Rasmussen J.E. // *Curr. Top. Cell. Reg.*, 1990. Vol. 31. P. 1–109.
17. Reid G., Babes A. and Pluteanu F. // *Journal of Physiology.* 2002. Vol. 545(2), P. 595–614.
18. Schaffer K., Braun H.A. // *Physiol. Rev.* 1992. Vol. 41. P. 5–71.
19. Sulakhe P.V., Luis P.J. // *Molecul. Biol.* 1980. Vol. 35. P. 135–195.