

Мамылина Н.В.¹, Павлова В.И.¹, **Рассохин А.Г.**, Янов А.Ю.²

Показатели костномозгового кроветворения и содержание продуктов липопероксидации в костном мозге у животных, перенесших эмоцио-нально-болевой стресс

1 - ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный педагогический университет», г. Челябинск; 2 - ФГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск

*Mamylyina N.V., Pavlova V.I., **Rassokhin A. G.**, Yanov A. Yu.*

Marrow hematopoiesis indices and lipoperoxidation content in the marrow of animals undergoing the emotional-painful stress

Резюме

В статье представлены результаты экспериментального исследования влияния эмоционально-болевого стресса на ряд показателей костномозгового кроветворения во взаимосвязи с уровнем первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в костном мозге. Показано, что в результате действия 6-часового эмоционально-болевого стресса наблюдалось угнетение эритропоэза в костном мозге у экспериментальных животных, что свидетельствует о повреждающем действии эмоционально-болевого стресса на ткань костного мозга. Выявлены взаимосвязи показателей костномозгового кроветворения и стресс-реализующей системы перекисного окисления липидов в ткани костного мозга у экспериментальных животных

Ключевые слова: эмоционально-болевой стресс, костный мозг, перекисное окисление липидов, эритропоэз

Summary

The article presents the results of experimental study of the emotional-painful stress effect on the number of indices in interrelation with the level of primary and secondary products of lipid peroxidation in the marrow. It is shown that 6-hour emotional-painful stress has caused the inhibition of eritropoieses in the marrow of experimental animals testifying the damage of their marrow tissue caused by it. The interrelation between marrow hematopoieses indices and indices of lipid peroxidation stress-realizing systems in marrow tissues of experimental animals has been revealed.

Key words: the emotional-painful stress, marrow, lipid peroxidation, eritropoieses

Введение

Влияние стрессоров различной этиологии на гемопоэз связано с активацией симпато-адреналовой системы [1]. В системе крови при воздействии на организм разных стрессоров происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2–4]. Активация ПОЛ приводит к накоплению продуктов липопероксидации, обладающих высокой реакционной способностью и оказывающих системное повреждающее действие на клетки [5–7]. Известно, что активация стресс-реализующих систем, является ответной реакцией организма, эволюционно отработанной и генетически запрограммированной на сдвиг про- и антиоксидантного равновесия, на увеличение количества активных форм кислорода (АФК) в органе-мишени [7,8]. Во время стресс-реакции формируется повышенная потребность в самообновлении клеток системы крови. Стресс-реакция – это универсальная адаптаци-

онная реакция, которая развивается в результате повреждающего действия экстремального агента и реализуется при посредстве медиатора, в качестве которого выступают продукты окислительной деградации, АФК. Важным эффекторным звеном этого стресс-реализующего механизма также является активация ПОЛ, обусловленная многократным увеличением в циркуляции количества катехола-минов [5].

Известно, что циркулирующие продукты ПОЛ могут вызывать генерализацию процесса липопероксидации в органах и тканях, в частности, в костном мозге. Повреждающее действие стрессорных факторов на костный мозг проявляется в нарушении функционирования его мембранных структур [7]. Однако в доступной нам литературе не содержится данных о содержании первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта ткани костного моз-

га при ЭБС во взаимосвязи с количеством миелокариоцитов, ядродержащих клеток эритроидного ряда и незрелых клеток в костном мозге.

Исследование механизмов повреждающего действия эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на организм человека и животных актуально на со-временном этапе, так как от состояния костномозгового крово-тока в ситуациях, связанных с болью и эмоциональным стрессом, во многом зависит жизнь организма и состояние здо-ровья.

Цель исследования - изучить взаимосвязь по-казателей костномозгового кровообращения и стресс-реализующей системы ПОЛ в ткани костного мозга у эксперимен-тальных животных, перенесших ЭБС, что способствует частичному выяснению механизмов по-вреждающего действия стресса на костный мозг.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 80 крысах самцах линии Вистар массой 150–200 г. Содержание животных и экспе-рименты проводились согласно международным нормам и правилам работы с позвоночными животными (Страсбург, 1999). Острый стресс воспроизводили у крыс линии Ви-стар по методике [9] в форме так называемого невроза тре-воги, продолжающегося один и шесть часов, а также спу-стя 2 часа, 1 и 2 суток после 6-часового ЭБС. Главными чер-тами этой модели ЭБС являются, во-первых, наличие кон-фликта между выработанным условным рефлексом избега-ния тока путём ухода на платформу и безусловным болевым раздражением на этой же платформе, во-вторых, напряжённое ожидание электроболевого воздействия, обусловленно-го тем, что электрические раздражения на платформе нано-сились через достаточно длительные и случайные проме-жутки времени [10]. После завершения стрессирования жи-вотных забивали под лёгким эфирным наркозом.

Уровень продуктов ПОЛ в костном мозге опреде-ляли спектрофото-метрически [11]. Традиционные ме-я

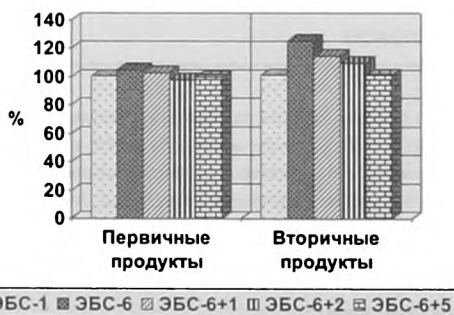


Рис. 1. Уровни первичных (ацилгидроперексидов и углеводородных конъюгатов) и вторичных (кетодиенов и сопряжённых триенов) продуктов ПОЛ в изо-пропанольной фазе липидного экстракта костно-го мозга. *Примечание:* уровни первичных и вторичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного эк-стракта выражены в процентах по отношению к кон-тролю, который принят за 100%.

тоды исследования костного мозга включают подсчет числа ядродержащих клеток и морфологический ана-лиз мазков – отпечатков [1]. При подсчёте миелокариоци-тов у животных использовали методику, предложенную Ю.М. Захаровым и А.Г. Рассохиным [12]. Считали число миелокариоцитов в 5 больших квадратах камеры Горяева после смешивания и интенсивного встряхивания 0,1 мл костномозговой взвеси клеток с 5 мл 3 % раствора уксу-сной кислоты. В этом случае расчет числа миелокариоци-тов проводился по формуле:

$$A2 = A1 \times 5 \times 105, \text{ где:}$$

A2 – абсолютное число миелокариоцитов, млн/бе-дро;

A1 – число миелокариоцитов в 5 больших квадра-тах камеры Горяева.

Статистическую обработку результатов исследова-ния проводили с использованием теста Манна – Уитни при помощи компьютерной программы «Statistica 8.0». Различия между группами признавались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Динамика показателей содержания продуктов липо-пероксидации в ткани костного мозга крыс, подвергших-ся действию эмоционально-болевого стресса, представ-лена на рисунках (рис. 1,2).

Из анализа полученных данных следует что, после 1-часового ЭБС содержание молекулярных продуктов ПОЛ, растворимых в изопропанол1,2, в костном моз-ге не отличалось от контрольных величин. В гептановой фазе первичные продукты ПОЛ костного мозга уменьши-лись на 4,0 %, а вторичные увеличились на 12, 0% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем.

После 6-часового ЭБС содержание первичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ в кост-ном мозге увеличилось на 5,0 % ($p < 0,05$); вторичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ – на 25,4 % (p

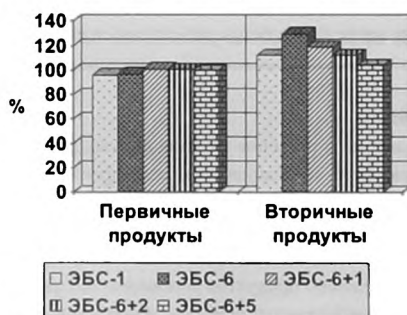


Рис. 2. Уровни первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта. *Приме-чание:* уровни первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта выражены в процентах по отношению к контролю, который принят за 100%

< 0,001) по сравнению с контролем. В гептановой фазе содержание первичных продуктов ПОЛ уменьшилось на 3,0 %, а количество вторичных продуктов ПОЛ увеличилось на 30,0 % ($p < 0,001$) по сравнению с контролем.

Через 1 сутки после 6-часового ЭБС содержание молекулярных продуктов ПОЛ, растворимых в изопропанол-1,2, превышало показатели контроля соответственно на 2,9 % и 14,9 % ($p < 0,01$). В гептановой фазе количество первичных продуктов ПОЛ было на уровне контрольных величин, а вторичных – выше на 18,9 % ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Содержание первичных и вторичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ в костном мозге через сутки после шестичасового ЭБС было меньше на 1,9 % и 8,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями после 6-часового ЭБС, а содержание молекулярных продуктов ПОЛ, растворимых в гептане-1, выше на 3,9 %, растворимых в гептане-2 – ниже на 8,5 % ($p < 0,001$) по сравнению с показателями 6-часового ЭБС.

Через 2 суток после 6-часового ЭБС содержание первичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ в костном мозге было ниже контроля на 2,1 %, а содержание вторичных изопропанол-растворимых продуктов – на 9,6 % ($p < 0,05$) превышало контрольные данные. В гептановой фазе содержание первичных продуктов ПОЛ не отличалось от контрольных величин, а содержание вторичных продуктов ПОЛ увеличилось на 12,0 % ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Содержание молекулярных продуктов ПОЛ, растворимых в изопропанол-1,2, в костном мозге через двое суток после 6-часового ЭБС снизилось соответственно на 6,7 % ($p < 0,001$) и 12,6 % ($p < 0,001$) по сравнению с соответствующими показателями 6-часового ЭБС. Содержание молекулярных продуктов ПОЛ, растворимых в гептане-1, в костном мозге через двое суток после 6-часового ЭБС было увеличилось на 3,7 %, а растворимых в гептане-2, снизилось на 13,9 % ($p < 0,001$) по сравнению с показателями 6-часового ЭБС.

Через 5 суток после 6-часового ЭБС содержание первичных и вторичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ в костном мозге было в пределах контрольных величин. В гептановой фазе содержание первичных продуктов ПОЛ не отличалось от контрольной величины, а содержание вторичных продуктов ПОЛ увеличилось на 3,9 % по сравнению с контролем. Содержание молекулярных продуктов ПОЛ, растворимых в изопропанол-1,2, в костном мозге через двое суток после шестичасового ЭБС было ниже соответственно на 5,3 % ($p < 0,01$) и 19,6 % ($p < 0,001$) по сравнению с шестичасовым ЭБС. Содержание молекулярных продуктов ПОЛ, растворимых в гептане-1, в костном мозге через двое суток после шестичасового ЭБС было выше на 2,9 % ($p < 0,01$), а растворимых в гептане-2, ниже на 20,1 % ($p < 0,001$) по сравнению с шестичасовым ЭБС.

При любом экстремальном воздействии активность ПОЛ может осуществляться через обычные механизмы острого и хронического стрессов. Через ПОЛ реализуется влияние гормонов стресса, выполняющих ведущую роль в неспецифической фазе адаптации [5]. Одними из первых структур в ответную реакцию организма на повреж-

дающее воздействие включаются эритроциты. Основным признаком повреждения мембран эритроцитов становится потеря последними текучих свойств. Показано, что в результате активации ПОЛ ускоряется перенос холестерина с липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) на эритроциты и замедляется его перенос с эритроцитов на липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) [6]. Происходит модификация фосфолипидного бислоя мембран, повреждение белкового скелета, в итоге это приводит к снижению эластичности мембран эритроцитов, трансформации их в ригидные формы, застревающие в капиллярном русле. Установлено участие свободных радикалов во внутрисосудистом гемолизе эритроцитов. Наиболее важными факторами, определяющими гемолитический эффект свободных радикалов, считают окисление полиненасыщенных жирных кислот в составе мембранного фосфатидилэтаноламина и тиоловых групп спектрина, ингибирование транспортных АТФаз и другие процессы, ведущие к снижению осмотической стойкости эритроцитов [6].

Свободнорадикальный гомеостаз клеток и тканей обеспечивается равновесием между ферментативными и неферментативными системами генерации активных форм кислорода, с одной стороны, и системами их элиминации, с другой стороны. Развитие патологических состояний, как правило, сопровождается возникновением неустойчивости в этом равновесии. Наиболее часто отмечается дисбаланс между этими системами, сопровождающийся сдвигом в сторону избыточной генерации свободных радикалов и/или дефицита антиоксидантов, который принято называть состоянием окислительного стресса [7,8,11]. В настоящее время признано, что окислительный стресс опосредует разнообразные повреждения внутренних органов и ЦНС при стрессе.

Поэтому повреждающая роль активных форм кислорода зачастую связана не столько с их прямым действием на клеточные структуры, а инициацией каскада процессов, ведущих к клеточному повреждению и развитию патологических состояний организма [7].

Содержание первичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ в костном мозге в результате действия острого ЭБС практически не отличалось от контрольных величин. В результате действия шестичасового ЭБС в ткани костного мозга наблюдалось увеличение содержания вторичных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ, представленных кетодиенами и сопряженными триенами, аналогичная тенденция имела место и для вторичных гептан-растворимых продуктов ПОЛ, содержащих нейтральные липиды, что свидетельствует о повреждающем действии ЭБС на ткань костного мозга. В течение 1–2 суток после ЭБС в костном мозге уровень вторичных продуктов ПОЛ в обеих фазах липидного экстракта продолжал оставаться достоверно повышенным по сравнению с контролем. Только в течение пяти суток наблюдалась нормализация показателей ПОЛ в обеих фазах липидного экстракта.

Таким образом, острое стрессирование вызвало активацию процессов липопероксидации в костном мозге у экспериментальных животных.

В результате исследования влияния ЭБС на ряд показателей костно-мозгового кроветворения у животных во взаимосвязи с процессами липопероксидации в ткани костного мозга нами были получены результаты, представленные на рис. 3.

После 1-часового ЭБС количество миелокариоцитов на бедро на 19,6 % ($p < 0,01$) было ниже контрольных данных. Количество ядросодержащих клеток эритроидного ряда уменьшилось на 8,9 % ($p < 0,05$), а незритроидных клеток – на 23,2 % ($p < 0,05$). В результате наблюдалось падение лейко-эритроцитарного коэффициента на 15,7 % ($p < 0,01$) по сравнению с контролем.

После 6-часового ЭБС количество миелокариоцитов на бедро на 27,3 % ($p < 0,05$) было ниже контрольных данных и на 9,6 % ниже данного показателя после одночасового ЭБС. Количество ядросодержащих клеток эритроидного ряда уменьшилось на 16,5 % ($p < 0,05$), а незритроидных клеток – на 30,9 % ($p < 0,05$), в результате наблюдалось снижение лейко-эритроцитарного коэффициента на 17,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. По сравнению с одночасовым ЭБС количество ядросодержащих клеток эритроидного ряда в результате действия 6-часового ЭБС снизилось на 8,3 % ($p < 0,05$), а незритроидных клеток – на 10,1 % ($p < 0,05$), в результате этого наблюдалось снижение лейко-эритроцитарного коэффициента на 2,0 %.

Таким образом, после 6-часового ЭБС усиливалась тенденция к угнетению костномозгового кроветворения по сравнению с кратковременным 1-часовым ЭБС.

Через 2 часа после 6-часового ЭБС количество миелокариоцитов на бедро на 31,9 % ($p < 0,05$) было ниже контрольных данных и на 6,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с шестичасовым стрессом. Количество ядросодержащих клеток эритроидного ряда уменьшилось на 21,2 % ($p < 0,05$), а незритроидных клеток – на 35,6 % ($p < 0,01$), в результате чего лейко-эритроцитарный коэффициент уменьшился на 18,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. По сравнению с шестичасовым стрессом количество клеток эритроидного ряда было ниже на 5,6 %, число незритроидных клеток – на 6,7 % ($p < 0,05$), а лейко-эритроцитарный коэффициент достоверно отличался от контроля в этот период стресса.

Через 1 сутки после 6-часового ЭБС количество миелокариоцитов на бедро на 14,9 % ($p < 0,05$) было выше контрольных данных и на 58,2 % ($p < 0,05$) превышало этот показатель по сравнению с шестичасовым стрессом. Количество ядросодержащих клеток эритроидного ряда в этот период было больше на 8,2 % ($p < 0,05$), а незритроидных клеток – на 17,3 % ($p < 0,05$), в результате наблюдалось повышение лейко-эритроцитарного коэффициента на 8,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. По сравнению с шестичасовым стрессом количество клеток эритроидного ряда было выше на 29,5 % ($p < 0,05$), число незритроидных клеток – на 69,9 % ($p < 0,001$), а лейко-эритроцитарный коэффициент на 31,3 % ($p < 0,05$) превышал аналогичный показатель через 1 сутки после шестичасового ЭБС.

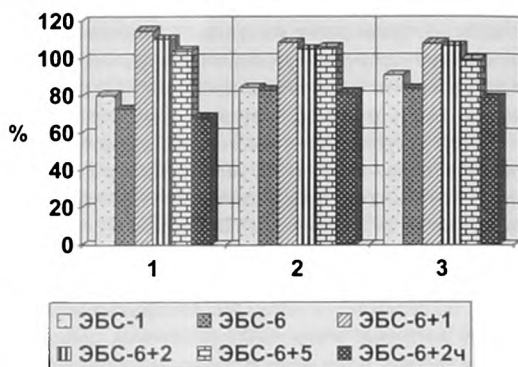


Рис. 3. Показатели костномозгового кроветворения у экспериментальных животных, подвергшихся действию эмоционально-болевого стресса

Примечание: на рисунке представлено количество миелокариоцитов (1), лейко-эритроцитарный коэффициент (2), количество эритроидных ядросодержащих клеток в костном мозге животных (3), выраженные в процентах по отношению к контролю, кото-рый принят за 100%.

Через 2 суток после 6-часового ЭБС количество миелокариоцитов на бедро на 10,4 % ($p < 0,05$) было выше контрольных данных и на 51,8 % ($p < 0,01$) было выше по сравнению с шестичасовым ЭБС. Количество ядросодержащих клеток эритроидного ряда увеличилось на 6,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и на 27,6 % ($p < 0,05$) – по сравнению с шестичасовым стрессом; количество незритроидных клеток увеличилось на 11,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и на 61,7 % ($p < 0,001$) по сравнению с шестичасовым ЭБС. В результате наблюдалось повышение лейко-эритроцитарного коэффициента на 4,8 % по сравнению с контролем и на 26,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с шестичасовым ЭБС.

Через 5 суток после 6-часового ЭБС количество миелокариоцитов на бедро на 4,1 % было выше контрольных данных и на 43,1 % ($p < 0,01$) – по сравнению с шестичасовым ЭБС. Количество ядросодержащих клеток эритроидного ряда достоверно отличалось от контроля и на 19,2 % ($p < 0,05$) было увеличено по сравнению с шестичасовым стрессом; количество незритроидных клеток было больше на 5,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и на 53,0 % ($p < 0,01$) – по сравнению с шестичасовым ЭБС; в результате наблюдалось повышение лейко-эритроцитарного коэффициента на 6,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и на 28,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с шестичасовым ЭБС.

Выводы

Таким образом, в результате действия эмоционально-болевого стресса наблюдалось достоверное уменьшение количества миело-кариоцитов, лейко-эритроцитарного коэффициента, а также количества ядросодержащих клеток эритроидного ряда и незритроидных клеток. В течение двух суток после действия 6-часового ЭБС данные показатели достоверно превышали контроль, что свидетельствует об активации эритропоэза в костном мозге

у экспериментальных животных. На пятые сутки после действия ЭБС произошла нормализация всех изученных показателей костномозгового кровотока.

Угнетение эритропоэза в ткани костного мозга у экспериментальных животных, перенесших шестичасовой эмоционально-болевого стресс, наблюдалось на фоне активации процессов липопероксидации в костном мозге. В результате действия шестичасового ЭБС нами выявлена отрицательная зависимость между количеством миелокарицитов и содержанием вторичных изопропанолрастворимых продуктов ПОЛ в костном мозге, представленных кетодиенами и сопряжёнными триенами ($r = -0,79$); между количеством миелокарицитов и содержанием вторичных гептан-растворимых продуктов ПОЛ в костном мозге, представленных нейтральными липидами, ($r = -0,80$), что свидетельствует об угнетающем действии активных форм кислорода, образующихся в результате активации процессов ПОЛ в костном мозге, на костномозговое кровообращение. В течение двух суток после действия 6-часового ЭБС также была выявлена отрицательная зависимость между увеличившимся количеством миелокари-

цитов и снизившимся содержанием вторичных изопропанолрастворимых продуктов ПОЛ ($r = -0,78$); между количеством миелокарицитов и содержанием вторичных гептан-растворимых продуктов ПОЛ ($r = -0,75$), что свидетельствует об активации пролиферативных процессов в костном мозге у экспериментальных животных на фоне снижения перекисного окисления липидов в ткани костного мозга. ■

Мамылина Н.В., к.б.н., доцент ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный педагогический университет», г. Челябинск; Павлова В.И., д.б.н., профессор ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный педагогический университет», г. Челябинск; Рассохин А.Г., д.м.н., профессор, Янов А.Ю., к.б.н., доцент ФГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку: Абдрахимова Оксана Данисовна: 454080, г. Челябинск, пр. Ленина, дом 69, abdrahimo-vaod@csru.ru

Литература:

1. Горизонтов П.Д., Белоусова О.И. Стресс и система крови. М.: Медицина; 1983; 238 с.
2. Цейликман В.Э., Пушкарев В.П., Захаров Ю.М., Павлова В.И., Рассохин А.Г. Влияние серии коротких иммобилизаций на показатели периферического отдела эритрона и эритробластические островки костного мозга крыс. Физиол. журн. им. И.М.Сеченова; 1991; 77(3): 41–46.
3. Шахов В.П. К вопросу о роли гемопозитических островков в развитии феномена стимуляции костномозгового кровотока при стрессе. Гематология и трансфузиология. 1988; 33(5): 19–21.
4. Юшков Б.Г. Система крови и адаптация организма к экстремальным воздействиям. Вестник РАМН. 2006; 3: 3–5.
5. Барабой В.А., Брехман И.И. ПОЛ и стресс. СПб: Наука; 1992; 148 с.
6. Бурлакова Е.Б. Роль липидов в процессе передачи информации в клетке (в кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука; 1981. 23–35).
7. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма. Патол. физиол.; 2007; 3: 2–18.
8. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Шергин С.М. Окислительный стресс. В кн.: Диагностика, терапия, профилактика. Новосибирск: Изд-во СО РАМН; 1993; 181 с.
9. Desiderato O., Mac Kinnon J.R., Hisson N.J. Development of gastric ulcers in rats following stress termination. Comp. physiol. Psychol. 1974; V. 87: 208–214.
10. Павлова В.И. Стрессорное повреждение организма и его предупреждение метаболитами стресс-лимитирующих систем: автореф. дис. д-ра биол. наук. Томск. 1990: 50 с.
11. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лившиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов. Вопросы медицинской химии; 1991; 4: 92–93.
12. Рассохин А.Г. Эритробластические островки костного мозга и их место в эритропоэзе в норме и при изменении состояния эритропоэза в организме: автореф. дис. д-ра мед. наук. Челябинск. 1997: 48 с.