

УДК 636:612.12:577.3
©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА НА СРОДСТВО КРОВИ К КИСЛОРОДУ, СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ

*А.Н. Мальцев**, *А.А. Грекова*, *Е.А. Киц*

Ставропольский научно–исследовательский институт животноводства и кормопроизводства, пер. Зоотехнический 15, ГНУ СНИИЖК, 355017 Ставрополь; тел.: 8(8652) 34-76-88, 34-18-72; эл. почта: maltsev7@rambler.ru

Эмоционально-болевым стресс вызывает более выраженное снижение сродства гемоглобина к кислороду в крови воротной вены, по сравнению со смешанной, что в свою очередь способствует увеличению напряжения кислорода в гепатоцитах и активирует свободнорадикальные процессы в микросомах печени. Активация ПОЛ сопровождается изменением физических свойств (микровязкость, полярность) мембран микросом. Однако, при увеличении продолжительности стресс-воздействия изменения в изучаемых нами системах приобретают адаптивный характер, что сопровождается постепенной нормализацией сродства крови к O₂, физических свойств мембран и повышением антиоксидантной защиты. Обсуждаются возможные механизмы взаимодействия данных систем в процессе адаптации и регуляции активности свободнорадикального окисления.

Ключевые слова: эмоционально-болевым стресс, регуляция свободнорадикального окисления, физические свойства микросомальных мембран, сродство гемоглобина к кислороду.

ВВЕДЕНИЕ. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что стрессовые ситуации могут вызвать или потенцировать развитие язвенной болезни желудка, двенадцатиперстной кишки, гипертонической болезни, атеросклероза и др. В развитии данных видов патологии важное место отводится активации свободнорадикальных процессов в данных органах [1]. В связи с этим предполагается, что при адаптации организма к стресс-факторам

* - адресат для переписки

БОЛЕВОЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА

важную роль играет антиоксидантная система организма. Однако, отсутствие корреляций между уровнем антиоксидантов в тканях и их устойчивостью к "окислительному стрессу", многостадийность процессов перекисного окисления липидов, предполагает многоуровневую мультисистемную организацию регуляции про-антиоксидантной системы [2]. Особое место в сложной иерархии данной системы занимают кислородсвязывающие свойства крови, являющиеся одним из важнейших факторов, определяющих, как условия диффузии кислорода в ткани, так и величину тканевого напряжения кислорода (pO_2) [3]. Известно, что снижение сродства крови к кислороду при повышенной потребности тканей в кислороде является одним из физиологических механизмов, обеспечивающих адекватное протекание окислительных процессов при состояниях напряжения (физической нагрузке, различных видах стресса и др.) [4-6]. С другой стороны, повышение pO_2 в клетке, вследствие снижения сродства гемоглобина к кислороду, может явиться причиной активации свободнорадикального окисления [2]. Очевидно, что одним из условий минимизации повреждающего воздействия кислорода на клеточные структуры является сопряженность физиологических механизмов доставки кислорода и биохимических процессов его потребления. Дисбаланс между этими процессами, как в ту, так и в другую сторону может усилить свободнорадикальное окисление, что в свою очередь способствует изменению физических свойств биомембран [7]. Известно, что их структурные и функциональные свойства тесно взаимосвязаны и являются весьма чувствительными к различным воздействиям. При этом отмечаются изменения состояния, как липидной и белковой фаз мембран, так и их взаимодействия [8-10], что может повлиять на активность мембрансвязанных белков, участвующих в выполнении различных функций, в том числе и антиоксидантной защиты. Имеются литературные данные о качественных и количественных изменениях структур биомембран, при воздействии на них радиации [11] и электромагнитных полей [12]. Однако, процесс сопряженности структурных и функциональных изменений биомембран, кислородсвязывающих свойств крови и активности свободнорадикального окисления при стрессе и во время адаптации к нему не изучен. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение влияния эмоционально-болевого стресса (ЭБС) на кислородсвязывающие свойства портальной крови, изменения прооксидантно-антиоксидантного равновесия микросом печени и физических свойств их мембран, а также была предпринята попытка выяснить взаимозависимость состояния данных систем при различной степени напряжения организма.

МЕТОДИКА. Опыты проведены на белых беспородных крысах самцах массой 150-200 грамм. Эмоционально-болевым стресс вызывался поочередным воздействием света, звонка и электрического тока силой 10 мА, частотой 0,5 Гц [1, 13] в течение 10 минут в одно и тоже время суток (утром). Забор материала (портальная - из *vena porta*, смешанная кровь - из правого предсердия и печень) осуществлялся у животных под тиопенталовым наркозом, сразу же после стресс воздействия. Анализировали влияние стресса различной продолжительности на кислородсвязывающие свойства смешанной и портальной крови, а также на прооксидантно-антиоксидантное состояние микросом гепатоцитов и физические свойства их мембран, после острого и хронического стресса и через сутки после него.

Содержание гемоглобина (Hb) измеряли спектрофотометрически. Сродство гемоглобина к кислороду оценивали по показателю $p50$, который определялся методом смешивания в модификации [14]. $p50_{\text{станд.}}$ измеряли в стандартных условиях ($pH=7,4$; $pCO_2 = 40$ мм рт. ст. и $T = 37^\circ C$), а $p50_{\text{реальн.}}$ рассчитывали для реальных значений pH , pCO_2 и температуры крови, определяемых в ходе эксперимента. Измерения газового состава крови

и показателей кислотно-основного состояния проводили на микрогазоанализаторе ABL-330 "Radiometer" (Дания).

Перед декапитацией животных лишали корма в течение 20 часов. В этих условиях в гепатоцитах наблюдается почти полное исчезновение депо гликогена, что позволяет избежать значительных потерь эндоплазматического ретикулума (соосаждение с митохондриями комплекса эндоплазматический ретикулум - гликоген) в процессе центрифугирования гомогената. Гемоглобин и другие белки крови удаляли из печени путём перфузирования органа через нижнюю полую вену охлаждённым до + 2°C 1,15% раствором KCl под давлением 100 мм рт.ст. в течение двух минут. После этого, её быстро выделяли, ополаскивали, отжимали на фильтровальной бумаге, взвешивали, измельчали и гомогенизировали в таком же растворе (масса ткани: раствор - 1:3) в гомогенизаторе типа Поттера-Эльвегейма с тефлоновым пестиком (скорость вращения - 400 об/мин, 7-8 разовых движений вверх-вниз). Все процедуры проводились при 0-4°C.

Микросомальную фракцию печени выделяли дифференциальным центрифугированием [15]. Целые клетки осаждали при 5000 об/мин в течение 5 минут, затем, для осаждения митохондрий, увеличивали скорость центрифугирования до 13000 об/мин в течение 10 минут на центрифуге К-24 ("Janetzki", Германия). Затем постмитохондриальный супернатант центрифугировали при скорости 33000 об/мин в течение 45 минут на центрифуге К-24 ("Janetzki", Германия). Осадок ресуспендировали в 0,1 М трис-HCl буфере (pH 7,4) и разводили в зависимости от целей опыта до концентрации 0,5, 2 или 4 мг белка в 1 мл. Содержание белка в пробе определяли по методу Lowry и соавт. [16].

Определяли продукты ПОЛ (диеновые конъюгаты (ДК) [17], малоновый диальдегид (МДА) [18], основания Шиффа (ОШ) [19], факторы антиоксидантной защиты (активность каталазы (КАТ) [20], супероксиддисмутазы (СОД) [21], содержание α -токоферола и ретинола) [22].

Титрование микросомальных мембран пиреном проводили по методике, описанной в работах [23, 24]. Регистрацию спектров эмиссии осуществляли на спектрофлуориметре SFL-1211A (SOLAR) при ширине щелей 10 нм со стороны возбуждения и 4 нм со стороны эмиссии. Спектры флуоресценции корректировали с учетом белковой флуоресценции при длинах волн $\lambda = 372$ нм и $\lambda = 393$ нм, и флуоресценции пирена, возбуждаемого светом с $\lambda = 280$ нм. Соотношение колебательных полос мономера при $\lambda = 372$ нм и $\lambda = 393$ нм характеризует такой физический параметр мембран, как полярность. Помимо мономерной флуоресценции, пирен способен образовывать димеры (эксимеры). Эксимеризация – диффузионно-лимитируемый процесс и определяется вязкостными свойствами окружения зонда, встроенного в микросомальную мембрану. Флуоресценцию эксимера наблюдали в области $\lambda = 462$ нм [25]. Соотношение мономерной полосы при $\lambda = 393$ нм и эксимерной при $\lambda = 462$ нм характеризует микровязкость липидной фазы мембран.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследование газотранспортной функции крови показало, что эмоционально-болевого стресс (ЭБС) приводит к повышению содержания гемоглобина (Hb) в смешанной венозной крови (табл. 1). При остром стрессе отмечается увеличение этого показателя, но за счёт высокой дисперсии, достоверности не наблюдается. Это можно объяснить индивидуальными особенностями реакции организма животных. Содержание Hb остается более высоким и через сутки после острого стресса. Максимальный рост Hb отмечается на 3-и сутки ЭБС и сохраняется на высоком уровне через сутки после 3-дневного стресса. Повышенное содержание Hb регистрируется и при 6-дневном стрессе. Затем происходит снижение Hb в венозной крови. В группе, которая была подвержена 10-дневному ЭБС, и через сутки после него содержание Hb не отличается от контрольного уровня.

БОЛЕВОЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА

Таблица 1. Изменение содержания гемоглобина, рН и сродства смешанной венозной крови крыс к кислороду (p50) при ЭБС.

Группа	Hb (г/л)	pH	p50 _{ст} (мм рт. ст)	p50 _{порт.} (мм рт. ст)
Контроль	113,4±9,5	7,289±0,04	30,3±2,2	34,3±2,8
Острый стресс	121,3±10,7	7,317±0,05	31,7±3,7	34,8±4,5
Сутки после острого стресса	120,7±4,9	7,180±0,04*	28,9±2,4	36,9±3,8
Стресс 3 дня	123,2±1,9*	7,329±0,01	32,9±1,1*	35,9±1,8
Сутки после 3-х дней стресса	124,5±5,3*	7,259±0,04	33,5±0,8*	39,2±1,9*
Стресс 6 дней	123,2±12,2	7,281±0,02	33,5±1,7*	38,2±2,4*
Сутки после 6-ти дней стресса	119,0±2,9	7,336±0,03	34,6±2,1*	37,1±1,9
Стресс 10-ть дней	113,8±7,7	7,257±0,05	32,6±4,5	38,5±7,6
Сутки после 10-ти дней стресса	113,6±7,4	7,339±0,03	31,1±2,8	33,3±2,7

Примечание. Здесь и в таблицах 2 и 3 приведены среднее арифметические ± ошибки средних, n = 8; * - p < 0,05 по сравнению с контролем.

При исследовании газотранспортной функции портальной крови выявили снижение содержания Hb, в отличие от смешанной крови (табл. 2). Максимальный сдвиг данного показателя нами регистрировался на 3-и и 6-е сутки ЭБС.

Таблица 2. Изменение содержания гемоглобина, рН и сродства портальной крови крыс к кислороду (p50) при ЭБС.

Группа	Hb (г/л)	pH	P _{50 ст} (мм рт. ст)	P _{50 порт.} (мм рт. ст)
Контроль	115,3±4,3	7,248±0,05	32,8±2,3	37,9±3,7
Острый стресс	106,6±12,4	7,286±0,05	34,1±2,3	38,6±2,9
Стресс 3 дня	103,4±8,7*	7,319±0,03*	35,6±1,6*	38,9±2,7
Стресс 6 дней	102,7±3,8*	7,312±0,02*	34,9±2,7	38,4±2,6
Стресс 10 дней	108,6±8,7	7,293±0,04	33,7±2,1	38,1±2,3

Таким образом, при стрессе происходит увеличение содержания гемоглобина в смешанной венозной крови. Это может быть связано с выбросом резервных эритроцитов из депо, для улучшения доставки кислорода стресс-реактивным органам (мышцы, сердце, мозг и др.). Следует отметить, что изменения содержания гемоглобина в венозной крови напоминает типичную картину различных фаз стресса по Селье [26]. Наибольшее увеличение Hb после острого стресса отмечено на 3-и и 6-е сутки. Затем происходит снижение данного показателя до уровня контроля, что может свидетельствовать об адаптации данной системы. В то же время отмечается снижение содержания гемоглобина в портальной крови. Это, может быть связано с поступлением в портальные сосуды крови, с более низким гематокритом, или же снижением гематокрита, вследствие активации всасывания воды в желудочно-кишечном тракте во время стресса.

В смешанной венозной крови рН во время стресса не изменяется. Следует отметить сдвиг рН в кислую сторону через сутки после острого стресса (табл. 1). В портальной крови отмечается достоверный сдвиг рН в щелочную сторону после 3-х и 6-ти дней стресса (табл. 2). Сдвиг рН в щелочную сторону в портальной крови и отсутствие изменений в смешанной крови могут быть связаны с усиленной секрецией ионов водорода в желудке.

Исследование сродства смешанной крови к кислороду показывает, что происходит увеличение стандартного р50 после стресса. После острого стресса р50 незначительно повышается, однако через сутки отмечается снижение данного показателя ниже контрольного значения. Наиболее высокие значения р50 наблюдаются после 3-, 6-дневных стрессов и через сутки после них. Это свидетельствует о снижении сродства гемоглобина к кислороду. Затем сродство гемоглобина к кислороду повышается. После 10-дневного стресса и через сутки после него показатель р50 достоверно не отличается от контроля. Аналогичная картина наблюдается и для реального р50. Максимальное снижение сродства гемоглобина к O_2 отмечалось через сутки после 3-дневного, и при 6-дневном стрессе (табл. 1). Кроме того, в отличие от стандартного р50, через сутки после острого стресса отмечалось снижение сродства Нб к O_2 .

Следует отметить более низкое сродство портальной крови к кислороду в контроле и более выраженное увеличение стандартного р50 в портальной крови, по сравнению со смешанной, в особенности на 3-и сутки ЭБС. Реальный показатель р50 портальной крови немного повышался на протяжении всего эксперимента (табл. 2).

Сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо как в смешанной венозной, так и в портальной крови свидетельствует о снижении сродства гемоглобина к кислороду и об увеличении способности крови к деоксигенации. Изменение стандартного р50 во время ЭБС может быть обусловлено изменением концентрации 2,3-ДФГ или же перераспределением его свободных и связанных фракций в эритроците [27]. Наиболее выраженные изменения данного показателя отмечались в портальной крови, что, на наш взгляд, может быть связано с компенсацией уменьшения гематокрита, кислородной емкости портальной крови и снижением портального кровотока во время стресса. Так, при снижении Нб и величины гематокрита в эритроцитах увеличивается содержание 2,3-ДФГ [28]. Таким образом, стрессовые воздействия вызывают сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина смешанной венозной, а в особенности портальной крови вправо, что отражает снижение сродства Нб к кислороду и способствует при прочих равных условиях повышению напряжения O_2 в крови и тканях.

Увеличение свободного кислорода в крови и тканях, в свою очередь, является одной из причин активации свободнорадикальных процессов, в частности в печени, вследствие снижения сродства портальной крови к кислороду, что приводит к активации свободнорадикального окисления (СРО) в микросомах печени. Мы выявили, что острый ЭБС приводит к незначительному повышению образования ДК и ОШ в микросомах печени, которое продолжает увеличиваться через сутки (табл. 3). Причем, следует отметить, что в этот период данные показатели достигают своих максимальных величин. Содержание МДА также увеличивается после острого стресса, однако, в отличие от ДК и ОШ через сутки после стресса содержание МДА снижается.

При 3- и 6-дневных стрессах содержание ДК и ОШ снижалось. Однако, их показатели достоверно превышали значения контроля. В эти сроки отмечено увеличение содержания МДА. Через сутки после 3-х и 6-ти дней стресса содержание ДК, МДА и ОШ снижалось.

На 10-й день стресса содержание ДК снижалось, практически до уровня контроля, а МДА и ОШ превышало контрольный уровень. Через сутки после 10-дневного стресса МДА и ОШ оставались высокими (табл. 3).

Таблица 3. Изменение прооксидантно-антиоксидантного состояния микросом печени при ЭБС.

Опыт	ДК (нмоль/ мг белка)	МДА (нмоль/ мг белка)	ОШ (ЕД/ мг белка)	КАТ (мкмоль/ H ₂ O ₂ /мг ссек)	СОД (% ингибирования/ мг белка)	α-токоферол (мкмоль/ мг белка)	ретинол (мкмоль/ мг белка)
Контроль	100,83±35,79	21,44±1,31	26,07±8,06	199,5±79,68	69,03±7,61	15,20±8,44	2,25±1,38
Острый стресс	148,37±55,19	34,67±5,16*	50,87±12,84*	274,5±81,4	72,61±7,11	20,83±8,85	1,80±0,46
Сутки после острого стресса	162,87±58,45*	32,21±6,56	56,72±7,10*	311,2±42,2*	84,34±4,37*	23,01±9,07	2,17±1,36
Стресс 3 дня	138,25±95,58	44,87±8,95*	32,70±5,11	127,9±30,6	56,76±7,03*	9,98±3,13	2,03±0,89
Сутки после 3-х дней стресса	115,90±61,64	36,32±6,76*	22,66±3,47	322,5±44,7*	73,31±4,06	6,67±1,20*	1,22±0,40
Стресс 6 дней	133,71±61,76	45,47±9,57*	36,34±6,18*	147,63±62,5	49,96±5,66*	11,56±6,46	1,97±0,58
Сутки после 6-ти дней стресса	106,46±42,18	38,58±6,46*	26,06±2,11	328,1±32,4*	52,48±4,81*	7,69±1,02	1,47±0,81
Стресс 10-ть дней	103,40±16,68	35,57±4,24*	37,22±3,64*	216,6±44,9	56,30±8,13*	10,07±2,22	2,31±1,40
Сутки после 10-ти дней стресса	136,74±50,00	36,47±8,24*	44,98±11,21*	215,2±68,1	60,10±6,88	17,48±11,54	1,74±0,86

Острый стресс приводит к повышению активности антиоксидантных ферментов КАТ и СОД и содержания α -токоферола в микросомах печени. Через сутки после острого стресса активность антиоксидантных ферментов и содержание витамина Е продолжало расти (табл. 3). 3- и 6-дневные стрессы приводят к падению активностей КАТ и в особенности СОД. В этот же период наблюдалось резкое снижение содержания α -токоферола в микросомах. Через сутки после 3-х и 6-ти дней стресса активности КАТ и СОД возрастали, причём подъём активности КАТ был более выражен, чем СОД. Содержание витамина Е в микросомах после 3-х и 6-ти дней стресса снижалось. Снижение содержания α -токоферола продолжалось и через сутки после данных воздействий.

К 10-му дню стресса активности КАТ и СОД начинали постепенно возрастать, причём активность КАТ даже немного превышали уровень контроля. Через сутки после 10 дней стресса активность КАТ не изменялась, в то время как СОД немного возрастала и приближалась к уровню контроля. Содержание α -токоферола лишь через сутки, после 10-дневного стресса, достигало контрольных значений. Содержание витамина А в микросомах печени достоверно не изменялось во все сроки стресса, хотя средние значения снижались (табл. 3).

Таким образом, снижение сродства гемоглобина к O_2 в портальной крови способствует повышению поступления кислорода в гепатоциты. Максимальные изменения $p50$ имели место на 3-и и 6-е сутки. Увеличение напряжения кислорода в печени, в свою очередь, способствует активации свободнорадикальных процессов в микросомах. Имеются практические и теоретические работы показывающие, что скорость свободнорадикальных процессов и ПОЛ зависят от концентрации O_2 [29]. Так, при остром стрессе и через сутки после него мы наблюдали, как активацию ПОЛ, так и повышение антиоксидантной защиты. Затем на 3-и и 6-е сутки стресса происходило незначительное снижение ОШ и ДК, что, на наш взгляд, связано с изменением жирнокислотного состава фосфолипидов микросом. По имеющимся литературным данным, при активации ПОЛ происходит снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембран, которые являются субстратом для образования ДК [30]. Кроме того, имеются данные, что высокое pO_2 приводит к снижению индекса ненасыщенности и потере двойных связей в фосфолипидах мембран эндотелиальных клеток [31]. Повышенное содержание МДА свидетельствует о высокой активности ПОЛ. На ранних этапах стресса, наряду с усилением процессов ПОЛ, наблюдается и активация антиоксидантной защиты за счёт повышения активности СОД и КАТ (табл. 3). Это подтверждается и литературными данными. Известно, что при экспериментальном синдроме перекисаации, вызванного исключением из рациона животных антиоксидантных витаминов, наблюдается рост активности ферментов (СОД, КАТ и др.) на начальных этапах и последующее снижение их активности [32]. Авторы предполагают, что снижение активности СОД и КАТ связано с повреждением генов, ответственных за биосинтез антиоксидантных ферментов, продуктами ПОЛ. Мы не считаем, что в нашем эксперименте снижение активности антиоксидантных ферментов, связано с нарушением их биосинтеза, поскольку в поздние сроки стресса мы наблюдаем рост их активности в микросомах печени. На наш взгляд, данная динамика обусловлена взаимовлиянием антиоксидантных витаминов и ферментов. Например, известно, что повышение содержания α -токоферола в митохондриях печени снижает активность СОД и, наоборот, его снижение приводит к активации фермента [33]. В нашем эксперименте заслуживают внимания данные о повышении содержания антиоксидантных витаминов после острого стресса и через сутки после него. Для инактивации свободных радикалов, в отличие от ферментов, требуется эквимольное их расходование. Это, вероятно, обусловлено повышением поступления антиоксидантных витаминов в микросомы из депо гепатоцитов. Кроме того, возможно, происходит активация процесса восстановления NADH

БОЛЕВОЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА

сукцинатом и в окислительном процессе, связанная с восстановлением цитохрома С, что предотвращает как накопление токофероксильных радикалов, так и расход витамина Е [34].

Прооксидантно-антиоксидантное состояние микросом печени во время ЭБС коррелирует с изменением физических свойств их мембран. Изменение полярности окружения зонда, встроенного в свободные липиды, показано на рисунке 1. Максимальное увеличение данного показателя регистрировалось через сутки после острого стресса, а на 3-и сутки стресса происходило его снижение. Через день после 3-дневного стресса полярность свободных липидов возвращалась к контрольным значениям. В дальнейшем при 6- и 10-дневных стрессах полярность немного превышала контрольный уровень, а через сутки после этих воздействий практически не изменялась.

Полярность анулярных липидов (рис. 1) изменялась аналогичным образом. Однако, данные изменения выражены в большей степени, по сравнению со свободными липидами.

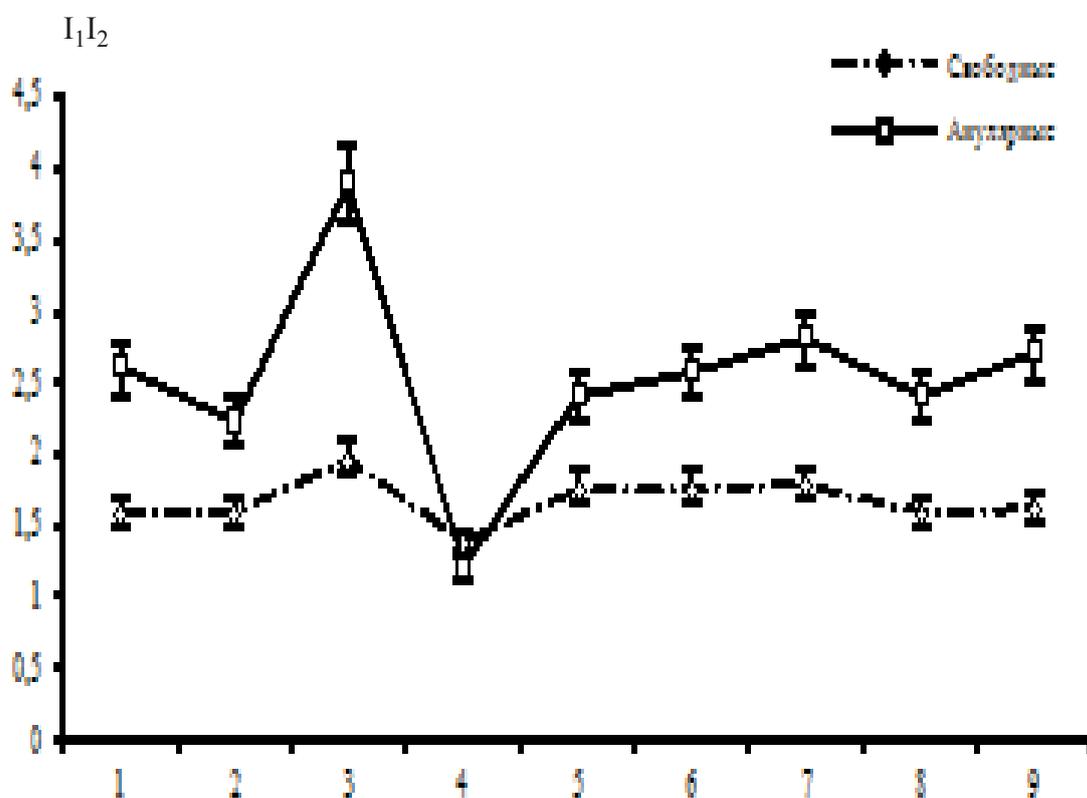


Рисунок 1.

Изменение полярности липидной фазы микросомальных мембран гепатоцитов при эмоционально-болевого стрессе. I_1 - интенсивность флуоресценции мономера при $\lambda = 372$ нм; I_2 - интенсивность флуоресценции мономера при $\lambda = 393$ нм. (1) - контроль, 2) - острый стресс, 3) - сутки после острого стресса, 4) - стресс 3 дня, 5) - сутки после 3-х дней стресса, 6) - 6-ть дней стресса, 7) - сутки после 6-ти дней стресса, 8) - 10-ть дней стресса, 9) - сутки после 10-ти дней стресса).

Микровязкость свободных липидов (рис. 2) при остром стрессе практически не изменялась, но возрастала через сутки после него. В последующем после 3-дневного стресса данный показатель немного снижался, однако всё еще превышал контроль. Через сутки после 3-дневного стресса происходило его снижение ниже контрольного уровня, а затем при дальнейшем стрессировании микровязкость свободных липидов микросомальных мембран гепатоцитов постепенно повышалась, приближаясь к уровню контроля.

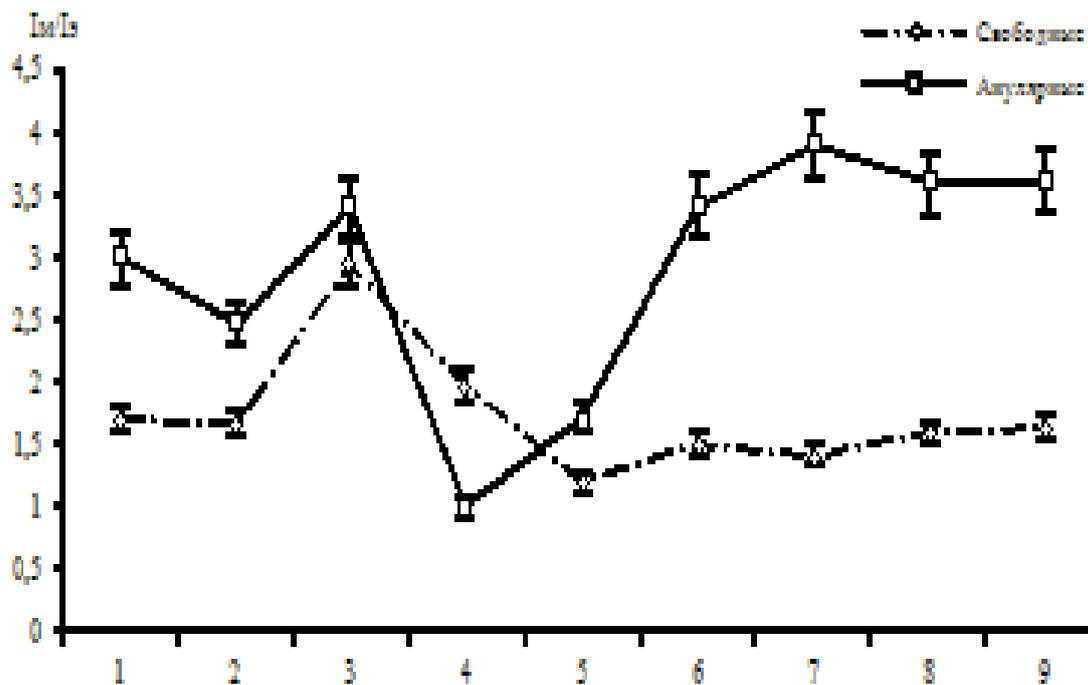


Рисунок 2.

Изменение микровязкости липидной фазы микросомальных мембран гепатоцитов при эмоционально-болевым стрессе. I_m - интенсивность флуоресценции мономера при $\lambda=372$ нм; I_s - интенсивность флуоресценции эксимера при $\lambda = 462$ нм. (1) - контроль, 2) - острый стресс, 3) - сутки после острого стресса, 4) - стресс 3 дня, 5) - сутки после 3-х дней стресса, 6) - 6-ть дней стресса, 7) - сутки после 6-ти дней стресса, 8) - 10-ть дней стресса, 9) - сутки после 10-ти дней стресса).

В области анулярных липидов, при остром стрессе, микровязкость уменьшалась, однако через сутки после этого происходило увеличение микровязкости, значения которой превышали контрольный уровень. Стрессирование в течение 3-х дней вызывало резкое уменьшение микровязкости анулярных липидов мембран. Через сутки после 3-дневного стресса происходило увеличение микровязкости, однако, её значения достоверно находились ниже контрольного уровня. Затем на 6-е сутки стресса микровязкость повышалась выше контрольного уровня и в дальнейшем на протяжении остальных сроков эксперимента оставалась выше уровня контроля.

БОЛЕВОЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА

Как уже отмечалось, функциональные свойства биологических мембран тесно сопряжены с их физическим состоянием. При ЭБС мы наблюдали увеличение полярности свободных и анулярных липидов на следующие сутки после острого стресса. Установлено, что при активации ПОЛ наблюдается увеличение полярности бислоя на глубине 0,1-0,8 нм [7]. По мнению авторов, это обусловлено проникновением молекул воды в область локализации нитроксильного фрагмента в результате перекисной модификации поверхности бислоя. В нашем случае мы наблюдали более выраженное увеличение полярности анулярных липидов, по сравнению со свободными, на следующие сутки после острого стресса (рис. 1). В это же время наблюдалось увеличение содержания ДК и ОШ, рост активности СОД, КАТ и содержания α -токоферола. Образовавшиеся продукты ПОЛ на начальных этапах ЭБС способны модифицировать белки встроенные в микросомальную мембрану и, тем самым нарушать белок-липидные связи. Это может увеличивать упорядоченность липидного окружения, поскольку известно, что белки способствуют разупорядоченности липидов мембран [35]. Более жесткая структурированность липидной фазы микросомальных мембран приводит к увеличению их микровязкости, что мы и наблюдали на следующие сутки после острого стресса (рис. 2). Уменьшение полярности и микровязкости на 3 сутки является результатом включения адаптационных механизмов, связанных с активацией фосфолипидного обмена. Так, по имеющимся данным, динамика изменений спектра фосфолипидов связана с фазами адаптации и дезадаптации хронического стресса [36]. Мы предполагаем, что изменение физического состояния как анулярных, так и свободных липидов, может служить сигналом для включения процессов адаптации. В дальнейшем нами было показано, что мембрана релаксирует к нормальному состоянию по уровню про-антиоксидантного состояния и по физическим параметрам мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Кратковременное периодическое стрессирование (при умеренной силе стрессора) не сопровождается глубокими расстройствами метаболизма в исследованных органах и системах. Мы наблюдали активацию адаптационных процессов, как на уровне функционирования организма в целом (адаптация кислородтранспортной функции смешанной венозной крови), так и на субклеточном и молекулярном уровнях. Это подтверждалось адаптационными изменениями про-антиоксидантного состояния и физических свойств липидной фазы микросомальных мембран. Как видно из наших данных, эти процессы тесно взаимосвязаны. Во всех системах наблюдались симбатные изменения на 3-и сутки стрессирования. Так, изменение сродства гемоглобина к кислороду должно изменять оксигенацию гепатоцитов, что в свою очередь влияет на активность свободнорадикальных процессов и модификацию мембранных структур высокорективными продуктами ПОЛ. В то же время продукты окислительного стресса могут модифицировать Hb, белковые и липидные компоненты мембран эритроцитов, что в свою очередь может изменить сродство гемоглобина к кислороду [37]. Так, показано, что альдегидные продукты ПОЛ сдвигают кривую диссоциации HbO₂ влево [38]. По мнению авторов, модификация аминокетильных групп (образование внутри- и межбелковых сшивок альдегидными продуктами) в молекуле оксигемоглобина увеличивает скорость процесса аутоокисления и увеличивает сродство Hb к кислороду, уменьшая кооперативность процесса оксигенации.

Таким образом, можно предложить схему механизма адаптации регуляторных процессов свободнорадикального окисления (СРО) по принципу обратной отрицательной связи (схема). Инициатором развития окислительного стресса является усиление оксигенации тканей, вследствие снижения сродства гемоглобина к O₂, что приводит к повышению напряжения кислорода в тканях и повышению свободнорадикального окисления. Повышение альдегидных продуктов ПОЛ модифицирует Hb и мембраны эритроцитов, что сдвигает кривую диссоциации оксигемоглобина влево и повышает сродство Hb к O₂, тем самым снижая pO₂ в тканях и СРО.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меерсон Ф.З.* (1988) Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам, Медицина, М.
2. *Зинчук В.В., Борисюк М.В.* (1999) Бюлл. exper. биол. мед., **127**, 616-619.
3. *Zinchuk V.V.* (1999) J. Physiol. Biochem., **55**(4), 301-308.
4. *Braumann K.M., Boning D., Trost F.* (1979) Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol., **42**, 51-60.
5. *Mairbaur H., Humpeler E., Schwabeger G., Pessenhofer H.* (1983) J. Appl. Physiol.: Respir., Environ. Exercise Physiol., **55**(5), 1403-1407.
6. *Poyart Cl., Wajzman H.* (1990) Arch Int. Physiol. Biochim., **98**(3), 81-105.
7. *Панасенко О.М., Вольнова Т.В., Азизова О.А., Владимиров Ю.А.* (1987) Биол. мембраны, **4**, 875-881.
8. *Конев С.В.* (1987) Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы, Наука и техника, Минск.
9. *Heron D.S., Israeli M., Hershkowitz M., Samuel D., Shinitzky M.* (1981) Eur. J. Pharmacol., **72**(2), 361-364.
10. *Watts A., Volotovski J.D., Marsh D.* (1979) Biochem., **18**, 5006-5013.
11. *Бурлакова Е.Б.* (1996) Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье человека, М.
12. *Ильина С.А.* (1987) В сб: Механизмы биологического действия электромагнитных излучений, Пушино, с. 7.
13. *Disiderato O., MacKinnon J.R., Hisson H.* (1974) J. Comp. Physiol. Psychol., **87**(2), 208-214.
14. *Борисюк М.В., Добродей М.А., Дремза И.К. и др.* (1991) В сб.: Методы исследования массопереноса в системе микроциркуляции, Новосибирск, сс. 156-162.
15. *Карузина И.И., Арчаков А.И.* (1977) В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В.Н.) Медицина, М, сс.49-61.
16. *Lowry O.N., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
17. *Стальная И.Д.* (1977) В кн. Современные методы в биохимии. (под ред. Ореховича В.Н.) Медицина, М, с. 63-69.
18. *Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.* (1979) Anal. Biochem., **95**, 351-358.
19. *Fletcher B.L., Dillard C.J.* (1973) Anal. Biochem., **52**, 1-9.
20. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Б.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
21. *Чевари С., Чаба И., Секей И.* (1985) Лаб. дело, №11, 678-681.
22. *Черняускене Р.Ч., Варшкявичене З.З., Грибаускас П.С.* (1984) Лаб. дело, №6, 362-365.
23. *Окунь И.М., Калер Г.В., Волковец Т.М., Мережинская Н.В., Конев С.В.* (1986) Биохимия, **51**, 1132-1140.
24. *Самойленко С.Г., Окунь И.М., Аксенцев С.П. и др.* (1992) Биофизика, **37**(2), 290-294.
25. *Добрецов Г.Е.* (1989) Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов, Наука, М.
26. *Селье Г.* (1960) Очерки об адаптационном синдроме, Медгиз, М.
27. *Воронова И.Н.* (1978) Сродство гемоглобина человека к кислороду при некоторых патологических состояниях организма. Дисс. канд. биол. наук, Сыктывкар.
28. *Волжская А.М., Трошихин Г.В., Байшукурова А.К.* (1989) Физиол. журн. СССР, **75**, 227-231.
29. *Синицкий А.Э., Волков Е.И.* (1989) Биофизика, **34**, 230-234.
30. *Буко В.У., Немкевич В.В., Мальцев А.Н. и др.* (1994) Патол. физиол. exper. тер., **4**, 50-53.

31. *Brock E.R.* (1988) *Exp. Lung Res.*, **14**, 937-958.
32. *Бобырев В.Н., Воскресенский О.Н.* (1982) *Вопр. мед. химии*, **20**(2), 75-78.
33. *Ланкин В.Э., Тихадзе А.К., Ракита Д.Р., Помойнецкий В.Д., Вихерт А.М.* (1983) *Биохимия*, **48**, 1555-1559.
34. *Maguire J.J., Wilson D.S., Packer L.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**(36), 21462-21465.
35. *Берлинер Л.М.* (1979) *Метод спиновых меток. Теория и применение.* Мир, М, сс. 444-610.
36. *Атаджанов М.А., Баширова Н.С., Усманходжаева А.И. и др.* (1995) *Патол. физиол. экспер. тер.*, **3**, сс. 46-48.
37. *Заводник И.Б., Пилецкая Т.П., Степура И.И.* (1995) *Биол. мембраны*, **12**(4), 400-407.
38. *Заводник И.Б., Лапина Е.А.* (1996) *Биохимия*, **61**(1), 42-48.

Поступила: 14. 12. 2007.

**INFLUENCE OF EMOTIONAL-PAINFUL STRESS ON AFFINITY OF BLOOD TO OXYGEN,
THE STATE ANTIOXIDANT SYSTEM AND PHYSICAL PROPERTIES HEPATOCYTE
MICROSOMAL MEMBRANE**

A.N. Maltsev, A.A. Grekova, E.A. Kits

Stavropol Scientific-Research Institute of Animal Industries and Foragehood, per. Zootekhnicheskii 15,
Stavropol, 355017 Russia; tel.: 8(8652) 34-76-88, 34-18-72; e-mail: maltsev7@rambler.ru

The emotional-painful stress causes a more pronounced decrease in affinity of hemoglobin to oxygen in portal blood compared with mixed blood. This contributes to increased oxygen pressure in hepatocytes and activates free radical processes in liver microsomes. Activation of lipid peroxidation is accompanied by changes in physical properties (microviscosity, polarity) of microsomal membranes. However, the increase in duration of stress treatment changes in the studied parameters become adaptive; this is accompanied by gradual normalization in blood affinity to oxygen, physical properties of membranes and the increase in antioxidant defence. Possible mechanisms of interaction of these systems during adaptation and regulation of free radical oxydation are discussed.

Key words: emotional-painful stress, regulation of free radicals oxidations, physical properties of microsomal membrane, affinity of hemoglobin to oxygen.