

С.А. Бриллиант^{1,2}, Б.Г. Юшков^{1,2}

ГЕМОГЛОБИНОВЫЙ ОТВЕТ ОРГАНИЗМА НА ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ СТРЕСС

¹ ГАУЗ СО Институт медицинский клеточных технологий,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Широко известно, что в основе сдвигов в соотношении гемоглобиновых фракций периферической крови при действии на организм какого-либо экстремального фактора (острой массивной кровопотери, гепатэктомии и других) лежит перестройка эритропоэза. Однако, остаётся невыясненным вопрос о свойствах отдельных фракций, об изменении гемоглобинового профиля костного мозга, а также механизмах, регулирующих соотношение между фракциями гемоглобинов костного мозга и периферической крови в ответ на стрессорное воздействие. **Цель работы:** исследовать гемоглобиновый ответ организма на иммобилизационный стресс. **Материалы и методы.** Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250-300 г. В качестве стрессорного фактора применяли предложенную Н. Selye модель нервно-мышечного напряжения (иммобилизация животных на операционном столике на спине) в течение 6 часов однократно. Все животные были поделены на три группы: первую группу составляли интактные крысы, вторую — крысы, которых выводили из эксперимента спустя 6 ч после воздействия, и третью группу — животные, которых выводили из эксперимента на 2 сут после иммобилизационного стресса. У всех экспериментальных групп оценивали следующие показатели: общий анализ крови, содержание ретикулоцитов и эритроцитов с фетальными формами гемоглобина. Исследовали соотношения белковых фракций гемоглобина костного мозга и периферической крови методом электрофореза в полиакриламидном геле по Г. Мауреру. **Результаты.** После иммобилизационного стресса в периферической крови отмечали увеличение общего числа эритроцитов по сравнению с интактными животными. Количество ретикулоцитов и клеток, несущих фетальные формы гемоглобина, возрастало на оба срока после воздействия. В условиях иммобилизационного стресса наблюдали изменение соотношения отдельных белковых фракций гемоглобина в костном мозге и периферической крови. На 6 ч после иммобилизационного стресса отмечали в костном мозге увеличение 3, 6 белковых фракций и снижение 1, 2 изоформ гемоглобина. В периферической крови отмечали аналогичные изменения. На 2 сут после экстремального воздействия достоверно снижалось общее содержание гемоглобина в костном мозге. Происходило понижение 1, 2, 3 и 5 белковых фракций, что, возможно, обусловлено, выходом молодых (крупных) клеток из костного мозга в кровотоки для компенсации и восстановления общего состояния организма после стресса. **Выводы.** Таким образом, иммобилизационный стресс приводит к выходу молодых (крупных) эритроидных клеток из костного мозга и активации эритропоэза, о чем свидетельствует ретикулоцитоз. Активация эритропоэза характеризуется образованием и поступлением в периферическую кровь эритроцитов, содержащих кислородозависимые изоформы гемоглобина, что приводит к изменению соотношения между отдельными белковыми фракциями гемоглобина в костном мозге и периферической крови.

Ключевые слова: изоформы гемоглобина, фетальный гемоглобин, костный мозг, иммобилизационный стресс

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Бриллиант Светлана Александровна

svetlana.brilliant@bk.ru

Дата поступления 26.11.2020 г.

Образец цитирования:

Бриллиант С.А., Юшков Б.Г. Гемоглобиновый ответ организма на иммобилизационный стресс. <http://vestnikural.ru/article/1148> [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №4, с. 266–271, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-4-266-271

Введение

За последние годы представление о стрессе (или об общем адаптационном синдроме, как охарактеризовал его Г. Селье) значительно расширилось и представлено в работах ряда отечественных и зарубежных ученых [1-3].

Крыжановский Г.Н. описывает стресс, как «ответ не только на сильное воздействие, но и просто функциональное напряжение, которое присуще всем биологическим структурам» [4].

Показано, что в основе сдвигов в соотношении гемоглибиновых фракций периферической крови при действии на организм какого-либо экстремального фактора (острой массивной кровопотери, гепатэктомии и других) лежит перестройка эритропоэза [5-7]. Однако, остаётся невыясненным вопрос о свойствах отдельных фракций, об изменении гемоглибинового профиля костного мозга, а также механизмах, регулирующих соотношение между фракциями гемоглибинов костного мозга и периферической крови в ответ на стрессорное воздействие.

Цель работы: исследовать гемоглибиновый ответ организма на иммобилизационный стресс.

Методы исследования

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250-300 г. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли согласно правилам, описанным Международным Советом Медицинских Научных обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), а также в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» [Этический комитет ИИФ УрО РАН, протокол №01/20 от 8.04.2020 г.].

В качестве стрессорного фактора применяли предложенную Н. Selye модель [8] нервно-мышечного напряжения (иммобилизация животных на операционном столике на спине) в течение 6 часов однократно. Крысы были поделены на 3 группы: 1 группа — интактные (n=12). Животных 2-ой (n=10) и 3-ей групп (n=10) выводили из эксперимента спустя 6 ч и 2 сут после иммобилизации.

У животных оценивали следующие показатели: общий анализ крови, содержание ретикулоцитов и эритроцитов с фетальными формами гемоглибина, соотношения белковых фракций гемоглибина костного мозга и периферической крови.

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Celly 70 фирмы Biocode-Hycel (Франция). Подсчет ретикулоцитов осуществляли в мазках крови, окрашенных бриллиантовым крезиловым синим. Для выявления эритроцитов, содержащих фетальные формы гемоглибина (рис. 1), мазки крови выдерживали в цитратно-фосфатном буфере (pH=4,5), затем в 1% растворе эозина (метод К. Betke-E.Kleihauer). Ретикулоциты и клетки с фетальным гемоглибином считали в мазках крови на 1000 эритроцитов, при увеличении $\times 100$ на световом микроскопе Leica DM 2500 (Германия).

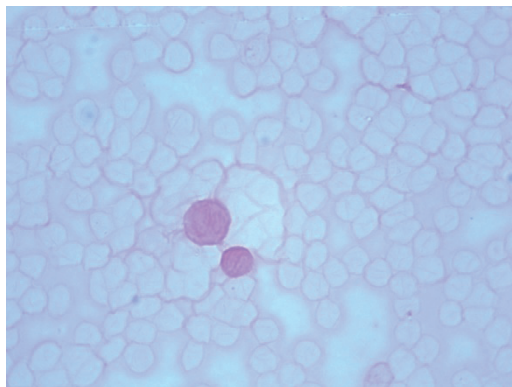


Рис. 1. Эритроциты, несущие кислотоустойчивые (фетальные) фракции гемоглибина.

Окраска по Betke-Kleihauer. (Ув. $\times 400$)

Fig. 1. Erythrocytes carrying acid-fast (fetal) hemoglobin fractions. Betke-Kleihauer staining. (x 400)

Для определения соотношения между фракциями гемоглибина костного мозга и периферической крови использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле по Г. Мауреру, (рис. 2) [9].

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете «Statistica 8.0». Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки ($M \pm m$). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

После иммобилизационного стресса в периферической крови нами отмечалось увеличение общего числа эритроцитов по сравнению с интактными животными. Количество ретикулоцитов и клеток, несущих фетальные формы гемоглибина, возрастало на оба срока после воздействия (таблица 1).

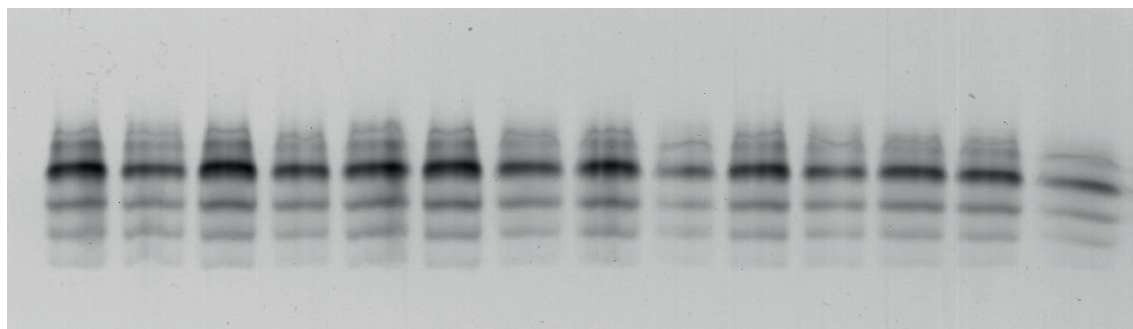


Рис. 2. Электрофореграмма костного мозга крыс. Окраска бензидином /

Fig. 2. Electrophoregram bone marrow of rats. Coloring with benzidine.

Таблица 1

Изменение количества эритроидных клеток в циркулирующей крови при иммобилизационном стрессе (Г/л) /

Table 1

Change in the number of erythroid cells in the circulating blood during immobilization stress (G / l)

	Эритроциты/ Erythrocytes	Ретикулоциты/ Reticulocytes	Клетки, с фетальным гемоглобином/ Cells with fetal hemoglobin	Ретикулоциты / Клетки, с феталь- ным гемоглобином/ Reticulocytes/ Cells with fetal hemoglobin
Интактные животные/ Intact	7515,01±133,07	117,84±8,85	114,91±4,81	1,03
6 ч /6h	9985,1±198,68*	440,65±28,07*	144,54±7,34*	3,05
2 сут/ 2 days	7881,2±77,14*	306,72±10,37*	224,09±10,37*	1,37

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы интактных животных (p<0,05)

Note: * — statistically significant differences from the group of intact animals (p<0,05).

При этом соотношение ретикулоцитов к клеткам с фетальным гемоглобином на 6 ч после воздействия увеличивается в 3 раза в отличие от группы интактных животных. К 2 сут после иммобилизации данный показатель возвращается к исходным величинам интактной группы (таблица 1). Данный феномен обусловлен тем, что на 6 ч после воздействия на фоне стресс-реакции происходит разрушение старых эритроцитов и усиленная работа молодых эритроидных клеток (ретикулоцитов и клеток, несущих фетальные формы гемоглобина) в костном мозге с последующим их выходом в кровоток для восстановления популяции эритроцитов. На 2 сут после иммобилизации количество молодых клеток в кровотоке приближается к группе интактных животных в ходе адаптации организма к стрессовой ситуации и запуска компенсаторно-приспособительных механизмов.

Рассматривая изменения диаметров эритроидных клеток после иммобилизации, отмечается увеличение диаметра эритроцитов, совместно с этим наблюдается нарастание диаметра ретикулоцитов как на 6 часов, так и на 2 суток после экстремального воздействия. Тем самым, диаметр клеток, несущих фетальные формы гемоглобина, наоборот, достоверно уменьшается на 2-е сутки после иммобилизационного стресса (таблица 2).

Таблица 2

Изменение диаметров эритроидных клеток при иммобилизационном стрессе, мкм

Table 2

Changes in the diameters of erythroid cells under immobilization stress, μm

	Эритроциты / Erythrocytes	Ретикулоциты/ Reticulocytes	Клетки, с фетальным гемоглобином/ Cells with fetal hemoglobin
Интактные/ Intact	6,27±0,047	9,72±0,055	10,98±0,138
6 ч / 6 h	7,48±0,231*	9,96±0,074*	10,81±0,140
2 сут/ 2 days	7,10±0,216*	10,38±0,095*	10,45±0,092*

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы интактных животных (p<0,05)

Note: * — statistically significant differences from the group of intact animals (p<0,05).

В ходе исследования было установлено, что у интактных животных общее содержание гемоглобина в костном мозге составляет 8,01±0,61 г/л, в то время как в периферической крови — 135,6±1,9 г/л (таблица 3).

В условиях иммобилизационного стресса наблюдается изменение соотношения отдельных белковых фракций гемоглобина в костном мозге и периферической крови. На 6 ч после иммобилизационного стресса отмечается

в костном мозге увеличение 3, 6 белковых фракций и снижение 1, 2 изоформ гемоглобина. В периферической крови отмечаются аналогичные изменения.

На 2 сут после экстремального воздействия достоверно снижается общее содержание гемоглобина в костном мозге (с $8,0 \pm 0,61$ г/л до $5,0 \pm 0,33$ г/л, $p < 0,05$). Происходит снижение 1, 2, 3 и 5 белковых фракций, что, возможно, обусловлено выходом молодых клеток из костного мозга в кровоток для компенсации и восстановления общего состояния организма после стресса (таблица 3).

Таблица 3

Изменение белковых фракций гемоглобина крыс после иммобилизации (г/л)

Table 3

Change in protein fractions of rat hemoglobin after immobilization (g/l)

	Hb, г/л	1f, г/л	2f, г/л	3f, г/л	4f, г/л	5f, г/л	6f, г/л
Интактные животные / Intact							
Костный мозг/ Bone marrow	$8,0 \pm 0,61$	$0,8 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,12$	$1,55 \pm 0,1$	$0,72 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,01$
Периферическая кровь/ Peripheral blood	$135,6 \pm 1,9$	$14,8 \pm 1,2$	$17,7 \pm 1,5$	$59,6 \pm 1,1$	$27,8 \pm 0,6$	$11,7 \pm 1,7$	$3,9 \pm 0,8$
6 ч/6 h							
Костный мозг/ Bone marrow	$7,4 \pm 0,32$	$0,5 \pm 0,01^*$	$0,4 \pm 0,01^*$	$4,0 \pm 0,02^*$	$1,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,02^*$
Периферическая кровь / Peripheral blood	$138,8 \pm 1,8$	$8,6 \pm 0,5^*$	$6,1 \pm 0,1^*$	$77,6 \pm 0,7^*$	$27,5 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,7$	$9,0 \pm 0,4^*$
2 сут/2 days							
Костный мозг/ Bone marrow	$5,0 \pm 0,33^*$	$0,6 \pm 0,01^*$	$0,3 \pm 0,001^*$	$2,2 \pm 0,05^*$	$1,4 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,01^*$	$0,3 \pm 0,03$
Периферическая кровь / Peripheral blood	$134,1 \pm 1,1$	$13,1 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,3^*$	$75,4 \pm 1,2^*$	$30,8 \pm 0,5^*$	$4,4 \pm 0,1^*$	$3,1 \pm 0,4$

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы интактных животных ($p < 0,05$)Note: * — statistically significant differences from the group of intact animals ($p < 0,05$).

В периферической крови на 2 сут после иммобилизации снижается 2, 5 белковые фракции за счет увеличения 3, 4 изоформ (таблица 3). Данные 3, 4 белковые фракции гемоглобина обладают более высоким сродством к кислороду.

Выводы

Таким образом, стресс приводит к выходу молодых эритроидных клеток из костного мозга и активации эритропоэза, о чем свидетельствует ретикулоцитоз. Активация эритропоэза характеризуется образованием и поступлением в периферическую кровь эритроцитов, содержащих кислородозависимые изоформы гемоглобина, что приводит к изменению соотношения между отдельными белковыми фракциями гемоглобина в костном мозге и периферической крови.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А18-118020590108-7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Филаретова Л.П. Стресс в физиологических условиях. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2010. Т. 96. № 9. С. 924–935.
2. Datson N.A., van den Oever J.M., Korobko O.B. et al. Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. Endocrinology. 2013. V. 154 (9). P. 3261–3272.
3. Хныченко Л.К., Сапронов Н.С. Стресс и его роль в развитии патологических процессов. Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. 2003. Т.2 №3 С.2-15.
4. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. М. 1997. С.216-229.
5. Блюменфельд Л. А. Гемоглобин. Соросовский образовательный журнал. 1998. №4. С.33-38.
6. Богомолова Н. В. Функциональная морфология клеток крови в условиях острого иммобилизационного стресса при облучении электромагнитными волнами миллиметрового диапазона / Н. В. Богомолова, В. Ф. Киричук, С. И. Киреев. Современные наукоемкие технологии. 2006. № 6. С. 43–44.
7. Юшков Б.Г., Климин В.Г., Северин М.В. Система крови и экстремальные воздействия на организм / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, М.В. Северин. Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 201 с.

8. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature. 1936. V.138. P.32
9. Maurer G. Disc-electrophoresis. Theory and practice of polyacrylamide gel electrophoresis / G. Maurer. M., 1971. 271p.

Авторы

Бриллиант Светлана Александровна

Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН)

Младший научный сотрудник

Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

Научный сотрудник

Российская Федерация, 620026, г. Екатеринбург, ул. К. Маркса, 22а

svetlana.brilliant@bk.ru

Юшков Борис Германович

Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН)

Заведующий лабораторией иммунофизиологии и иммунофармакологии, доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ

Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

Ведущий научный сотрудник

Российская Федерация, 620026, г. Екатеринбург, ул. К. Маркса, 22а

b.yushkov@iip.uran.ru

S. A. Brilliant^{1,2}, B. G. Yushkov^{1,2}

HEMOGLOBIN RESPONSE OF THE BODY TO IMMOBILIZATION STRESS

¹Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation;

²Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. It is known that changes in the ratio of peripheral blood hemoglobin fractions under the influence of an extreme factor on the body (acute massive blood loss, hepatectomy and others) are based on the restructuring of erythropoiesis. However, the question of the properties of individual fractions, of changes in the hemoglobin profile of the bone marrow remains unclear. The mechanisms are not clear, which regulate the ratio of hemoglobin fractions of the bone marrow and peripheral blood under stress. **Objective:** study the hemoglobin response of the body to immobilization stress. **Materials and methods.** The studies were carried out on male Wistar rats weighing 250-300 g. The model of neuromuscular tension proposed by H. Selye (immobilization of animals on the operating table on the back) was used as a stress factor once for 6 hours. All animals were divided into three groups: the first group consisted of intact rats, the second — rats that were withdrawn from the experiment 6 h after exposure, and the third group — animals that were withdrawn from the experiment 2 days after immobilization stress. In all experimental groups, the following parameters were assessed: complete blood count, the content of reticulocytes and erythrocytes with fetal forms of hemoglobin. The ratios of the protein fractions of hemoglobin of the bone marrow and peripheral blood were investigated by polyacrylamide gel electrophoresis according to G. Maurer. **Results of research.** We noted an increase in the total number of erythrocytes in the peripheral blood after immobilization stress in comparison with the group of intact animals. The number of reticulocytes and cells carrying fetal forms of hemoglobin increased for both periods after exposure. Under conditions of immobilization stress, a change in the ratio of individual protein fractions of hemoglobin in the bone marrow and peripheral blood was observed. At 6 h after immobilization stress, an increase in 3, 6 protein fractions and a decrease in 1, 2 hemoglobin isoforms were noted in the bone marrow. In peripheral blood, similar changes were noted. The total hemoglobin content in the bone marrow significantly decreased 2 days after the extreme exposure. A decrease in protein fractions 1, 2, 3, and 5 occurred, which is possibly due to the release of young (large) cells from the bone marrow into the bloodstream to compensate and restore the general state of the body after stress. **Conclusions.** Thus, immobilization stress leads to the release of young (large) erythroid cells from the bone marrow and the activation of erythropoiesis, as evidenced by reticulocytosis. The activation of erythropoiesis is characterized by the formation and entry into the

peripheral blood of erythrocytes containing oxygen-dependent hemoglobin isoforms, which leads to a change in the ratio between the individual protein fractions of hemoglobin in the bone marrow and peripheral blood.

Keywords: hemoglobin isoforms, fetal hemoglobin, bone marrow, immobilization stress

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Svetlana A. Brilliant
svetlana.brilliant@bk.ru

Received 26.11.2020

For citation:

Brilliant S.A., Yushkov B.G. Hemoglobin response of the body to immobilization stress. <http://vestnikural.ru/article/1148> [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 4, pp. 266–271. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-4-266-271 (In Russ)

REFERENCES

1. Filaretova L.P. Stress in physiological conditions. Russian physiological journal named I. M. Sechenov. 2010. V. 96 (9). P. 924–935. (in Russ)
2. Datson N.A., van den Oever J.M., Korobko O.B. et al. Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. *Endocrinology*. 2013. V. 154 (9). P. 3261–3272.
3. Khnychenko LK, Sapronov N.S. Stress and its role in the development of pathological processes. Reviews on wedge. pharmacol. and lek. therapy. 2003. V.2(3). P. 2–15. (in Russ)
4. Kryzhanovsky G.N. General pathophysiology of the nervous system. M. 1997. P. 216–229. (in Russ)
5. Blumenfeld L. A. Hemoglobin. *Soros Educational Journal*. 1998. N. 4. S.33–38. (in Russ)
6. Bogomolova N.V. Functional morphology of blood cells under conditions of acute immobilization stress during irradiation with millimeter-wave electromagnetic waves. N.V. Bogomolova, V.F. Kirichuk, S.I. Kireev. *Modern high technologies*. 2006. N. 6. P. 43–44. (in Russ)
7. Yushkov B.G., Klimin V.G., Severin M.V. The blood system and extreme effects on the body. B.G. Yushkov, V.G. Klimin, M.V. Severin. Yekaterinburg: UB RAS, 1999. 201 p. (in Russ)
8. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936. V. 138. P.32
9. Maurer G. Disc-electrophoresis. Theory and practice of polyacrylamide gel electrophoresis / G. Maurer. M., 1971. 271p.

Authors

Svetlana A. Brilliant

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (IIF UB RAS)

Junior researcher

106, Pervomayskay street, Yekaterinburg, Russian Federation, 620049

GAUZ SO Institute of Medical Cellular Technologies

Researcher science

22a, K. Marks str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026

svetlana.brilliant@bk.ru

Boris G. Yshkov

Institute of immunology and physiology of URO Russian Academy of Sciences (IIF UB RAS)

Head of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology, Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored worker of science of the Russian Federation

106, Pervomayskay street, Yekaterinburg, Russian Federation, 620049

GAUZ SO Institute of Medical Cellular Technologies

Leading Researcher

22a, K. Marks str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026

b.yushkov@iip.uran.ru