

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.014.4+616.092.9
doi:

Специфические изменения конформации молекулы альбумина крови при стрессорных воздействиях и введении цитокинов или олигопептидов

Перцов С.С.^{1,2}, Коплик Е.В.¹, Смолина Н.В.³, **Судаков К.В.**¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина»,
Россия, 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Физический институт им. П.Н. Лебедева»
Российской академии наук, 119991, Россия, ГСП-1, Москва, Ленинский проспект, д. 53, ФИАН

Цель данной работы состояла в изучении структурных особенностей молекулы альбумина в крови поведенчески пассивных и активных крыс, прогностически предрасположенных и устойчивых к стрессорным воздействиям, при введении цитокинов и олигопептидов. **Методы.** Эксперименты проведены на 319 крысах-самцах Вистар с массой тела $220,0 \pm 5,2$ г. Крыс предварительно тестировали в открытом поле с оценкой поведенческих показателей и делили на пассивных ($n = 126$) и активных особей ($n = 124$). Животные с высокой ориентировочно-исследовательской активностью в данном тесте более устойчивы к стрессорным нагрузкам, чем пассивные особи [20, 21]. Структурные особенности молекулы альбумина в крови пассивных и активных крыс изучали до и после введения цитокинов и олигопептидов. **Результаты.** Установлено, что острая стрессорная нагрузка приводит к изменению свойств альбуминовых центров. Флуоресценция зонда CAPIDAN, как показатель состояния связывающих центров альбумина, в указанных условиях увеличивается у активных особей, но уменьшается у пассивных животных. Предварительное введение Семакса и пептида, вызывающего дельта-сон, модулирующих чувствительность к отрицательным последствиям стресса, оказывает влияние на альбуминовые показатели крови. В частности, Семакс снимает конформационные изменения молекулы сывороточного альбумина у крыс, предрасположенных к постстрессорным изменениям физиологических функций. Выявлено, что провоспалительный цитокин интерлейкин-1 β и противовоспалительный цитокин интерлейкин-4 оказывают однонаправленное действие на свойства связывающих центров альбумина крови у особей с разными параметрами поведения. Интерлейкин-1 β и интерлейкин-4 предупреждали вызванные отрицательным эмоциогенным воздействием изменения связывающей способности альбумина как у устойчивых, так и у предрасположенных к стрессу животных. **Заключение.** Более выраженные эффекты цитокинов на альбуминовые показатели крови у активных крыс по сравнению с пассивными особями связаны с различиями общей концентрации альбумина, обнаруженными у них в исходном состоянии. Кроме этого, указанные особенности могут быть обусловлены спецификой метаболических процессов у животных с разными характеристиками поведения.

Ключевые слова: альбумин крови, крысы, поведение, стресс, устойчивость, индивидуальные различия.

Для корреспонденции: Перцов Сергей Сергеевич, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор. e-mail: s.pertsov@mail.ru

Для цитирования: Перцов С.С., Коплик Е.В., Смолина Н.В., Судаков К.В. Специфические изменения конформации молекулы альбумина крови при стрессорных воздействиях и введении цитокинов или олигопептидов. Патогенез. 2017; 15(2): 37–44

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.02.2017

Specific changes in the conformation of blood albumin molecule during stress exposures and administration of cytokines or oligopeptides

Pertsov S.S.^{1,2}, Koplík E.V.¹, Smolina N.V.³, **Sudakov K.V.**¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology»;
8, Baltiyskaya ul., Moscow, 125315 Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry»

Structural peculiarities of the albumin molecule in blood samples from behaviorally passive and active rats (prognostically predisposed and resistant to stress exposures, respectively) were evaluated after administration of cytokines and oligopeptides. We revealed that acute stress is followed by a change in the properties of albumin sites. Under these conditions fluorescence of the CAPIDAN probe (criterion for the state of albumin binding sites) is elevated in active specimens, but decreases in passive animals. Pretreatment with Semax and delta sleep-inducing peptide, which modulate the sensitivity to negative consequences of stress, was shown to affect albumin parameters in the blood. For example, Semax abolishes a conformational change of the serum albumin molecule in rats predisposed to post-stress abnormalities in physiological functions. Our study showed that a proinflammatory cytokine interleukin-1 β and anti-inflammatory cytokine interleukin-4 have a unidirectional effect on the properties of albumin binding sites in specimens with various behavioral characteristics. Interleukin-1 β and interleukin-4 prevent a change in the binding capacity of albumin in stress-resistant and stress-predisposed animals after a negative emotiogenic exposure. The influence of cytokines on blood albumin parameters is more pronounced in behaviorally active rats than in passive specimens, which results from differences in the total albumin concentration in these animals under basal conditions. Moreover, these features can be related to the specifics of metabolic processes in animals with various behavioral characteristics.

Keywords: blood albumin; rats; behavior; individual resistance to stress; biologically active molecules

For correspondence: Sergey S. Pertsov, Doctor of Medical Science, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor. Deputy Director, Head of the Laboratory for Systemic Mechanisms of Emotional Stress. Moscow, Russia. e-mail: s.pertsov@mail.ru

For citation: Pertsov S.S., Koplík E.V., Smolina N.V., Sudakov K.V. Specific changes in the conformation of blood albumin molecule during stress exposures and administration of cytokines or oligopeptides. *Pathogenesis*. 2017; 15(2): 37–44 (in Russian).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 14.02.2017

Введение

Альбумин — основной белок внеклеточных жидкостей тела млекопитающих. Обеспечивая транспортную функцию крови, альбумин является переносчиком гормонов, токсических метаболитов (например, билирубина), неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК), ионов металлов (Cu²⁺, Ni²⁺), оксида азота [1–3]. Это свойство молекулы альбумина обеспечивается наличием специальных участков — связывающих центров, взаимодействующих с лигандами [2, 4]. Характерно, что общая концентрация сывороточного альбумина у человека остается неизменной при многих заболеваниях [5, 6]. Однако сама по себе молекула альбумина чрезвычайно лабильна, и изменение связывающих центров этого белка при метаболических нарушениях являются скорее правилом, чем исключением [6].

Наиболее чувствительным методом изучения свойств молекул альбумина является использование флуоресцирующих красителей, или зондов [5–7]. Зонды — небольшие органические молекулы, обратимо связывающиеся с альбумином, и их флуоресценция несет информацию о состоянии его связывающих центров [1]. Флуоресцентный тест позволяет определять общую концентрацию альбумина (ОКА) и регистрировать конформационные изменения его молекулы — отношение эффективной концентрации альбумина (ЭКА) к ОКА. Соотношение ЭКА/ОКА не зависит от концентрации альбумина и характеризует только состояние молекулы [6].

Изменения в молекуле альбумина, влияющие на флуоресценцию, оценивают с помощью эквивалента концентрации нормального, не измененного альбумина. Этим эквивалентом и является ЭКА [6, 7]. В норме у человека ЭКА близка к ОКА, но при изменениях конформации мо-

лекулы альбумина ЭКА изменяется и становится обычно значительно ниже ОКА. В отличие от ОКА, эффективная концентрация отражает количество свободных центров молекулы альбумина, доступных для связывания с лигандом. Специальная молекула («флуоресцентный зонд») после добавления в сыворотку связывается с гидрофобными карманами молекулы альбумина. Данный зонд реагирует не только на их количество, но и на «заполнение» токсическими метаболитами, а также на конформационные изменения, происходящие в молекуле альбумина.

Структура молекулы альбумина изменяется при ряде психических состояний (например, при некоторых формах депрессии), а также в условиях тяжелых органических нарушений [5]. Все это указывает на наличие связи между строением молекулы альбумина и психической деятельностью, что позволяет предполагать возможность изменения конформации молекулы альбумина при эмоциональном стрессе. Наши предыдущие эксперименты показали, что в общей популяции крыс при однотипных стрессорных нагрузках выявляются животные, предрасположенные или устойчивые к нарушениям различных физиологических функций [8, 9, 10].

Целью данной работы явилось изучение структурных особенностей молекулы альбумина в крови крыс с разной чувствительностью к негативным последствиям стрессорных воздействий. Принимая во внимание участие цитокинов в механизмах развития эмоционального стресса [12–18], оценивали характер влияния про- и противовоспалительных интерлейкинов на конфигурацию молекулы альбумина у особей, прогностически устойчивых и предрасположенных к стрессорным нагрузкам. В специальной серии опытов определяли способность антистрессорных олигопептидов — пептида, вызывающего дельта-сон

(ПВДС), и Семакса (аналог АКТГ₄₋₁₀) [19] — изменять конформацию альбумина после отрицательного эмоционального воздействия.

Методика

Эксперименты проведены на 319 крысах-самцах Вистар с массой тела $220,0 \pm 5,2$ г в осенне-зимний период. При проведении опытов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина (протокол №1 от 3.09.2005), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Крыс содержали в клетках при искусственном освещении (9.00—21.00 — свет, 21.00—9.00 — темнота) и $20\text{--}22^\circ\text{C}$ в условиях свободного доступа к воде и пище. До начала опытов животные проходили адаптацию к лабораторным условиям в течение 10 дней.

Крыс предварительно тестировали в открытом поле с оценкой поведенческих показателей на протяжении 5 минут. Как показали наши ранее проведенные опыты, животные с высокой ориентировочно-исследовательской активностью в данном тесте более устойчивы к стрессорным нагрузкам, чем пассивные особи [20, 21]. Для вычисления индекса активности крыс [20] сумму числа пересеченных периферических и центральных секторов, периферических и центральных стоек, а также исследованных объектов делили на сумму латентных периодов первого движения и выхода в центр открытого поля. В зависимости от исходных параметров поведения животные были разделены на пассивных ($n = 126$) и активных особей ($n = 124$), различающихся по индексу активности: $0,2\text{--}0,6$ и $4,5\text{--}6,0$ соответственно. Крысы ($n = 69$) с промежуточными значениями показателя были исключены из последующих опытов.

Через 3 суток после тестирования часть крыс подвергали экспериментальному стрессу — 1-часовой иммобилизации в индивидуальных пластиковых боксах, ограничивающих их подвижность. Контролем служили особи, проходящие процедуру хэндлинга с последующим нахождением в «домашних» клетках на протяжении 1 ч до декапитации.

Крысиний ИЛ-4 (Sigma, США) и рекомбинантный ИЛ-1 β (активность 10^8 ед/мг, ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России) в дозе 5 мкг/кг веса крысы разводили в 1 мл физиологического раствора. Цитокины или физиологический раствор (1 мл) вводили внутривентрально за 1 час до экспериментального стресса или за 2 часа до декапитации. В экспериментах с олигопептидами животные таким же путем получали аналог АКТГ₄₋₁₀ (Семакс) или ПВДС в дозе 35 мкг/кг в 1 мл физиологического раствора. Крыс са크рифицировали под легким эфирным наркозом; после декапитации кровь отстаивали в течение 45—60 минут и центрифугировали для получения сыворотки.

Свойства связывающих центров молекулы альбумина исследовали с помощью флуоресцентного зонда K-35 (N-карбоксихенилимид диметиламинонафталевой кислоты, CAPIDAN). ОКА и ЭКА в сыворотке крови определяли флуоресцентным методом со стандартными наборами реактивов «ЗОНД-Альбумин» (НИМВЦ ЗОНД, Москва, Россия). Данный подход позволяет изучать свойства

альбумина без выделения его из сыворотки крови [1, 6]. Таким образом, оценивали следующие показатели:

1) ОКА (г/л), не зависящую от конформационного состояния альбуминовой глобулы;

2) ЭКА (г/л), зависящую от концентрации и физико-химического состояния альбумина.

Вычисляли параметр ЭКА/ОКА, который не зависит от концентрации альбумина, но определяется свойствами его молекулы.

ЭКА и ОКА измеряли на флуориметре АКЛ-01 (Россия). Калибровку проводили с помощью небелковых имитаторов, аттестованных на величины ЭКА и ОКА по сыворотке крови человека. При калибровке устанавливали нормальные величины ЭКА несколько ниже, чем ОКА. Конформация молекулы альбумина у крыс отличается от таковой у человека. В крови крыс нормальные величины ЭКА превышают ОКА.

В работе применяли пальмитиновую кислоту, фосфатный буферный раствор (рН 7,4), трис(оксиметил)аминометан (Sigma). Электрофорез белков проводили с использованием N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина, персульфата аммония, акриламида, N,N'-метилен-бис-акриламида (Sigma).

Альбумин получали при фракционировании сывороток крови крыс [22]. Для осаждения глобулинов и липопротеинов к сыворотке добавляли равный объем раствора полиэтиленгликоля 3000 (рН 6,4) в конечной концентрации 150 г/л. Полученную смесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочная жидкость содержала фракцию альбумина. рН доводили до 7,4 добавлением 0,1 N гидроксида натрия. Осаждение считали удовлетворительным, если уровень альбумина во фракции глобулинов и липопротеинов не превышал 5% от такового в исходной сыворотке.

Спектры поглощения измеряли в кварцевых кюветках (оптический путь — 1 см) на спектрофотометре Beckman DU-7. Спектры флуоресценции определяли в стандартной кювете (сечение 1x1 см) на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 и корректировали с учетом спектральной чувствительности фотоэлектронного умножителя.

Для определения содержания НЭЖК фракцию альбумина, а также образец исходной сыворотки замораживали и хранили не более 5 суток при -15°C . Концентрацию НЭЖК измеряли ферментативным методом [23] с применением реактивов Randox (в соответствии с инструкцией производителя). Концентрацию общего белка определяли микробиуретовым методом, альбумина — с использованием бромкрезолового зеленого и реактивов Randox. Калибровка проведена с применением пальмитиновой кислоты (Sigma). Для проверки полноты экстракции НЭЖК пальмитиновую кислоту добавляли в раствор обезжиренного альбумина (Sigma) с последующей ее экстракцией. В результате была получена та же калибровочная кривая, характеризующая полную экстракцию жирной кислоты из альбумина.

Результаты опытов обрабатывали с помощью соответствующих статистических и аналитических методов с использованием пакетов программ STATISTICA 8.0 и Microsoft Office Excel 2007. Статистическую значимость различий между изучаемыми параметрами оценивали с помощью непараметрического *T*-критерия Вилкоксона и *U*-критерия Манна—Уитни. Числовые данные приведены как $M \pm SEM$.

Результаты

Как показано в наших предыдущих исследованиях, ОКА крови у активных крыс, получавших инъекции физиологического раствора, на 44,1% превышает таковую у пассивных животных [24]. Однако ЭКА у поведенчески активных и пассивных особей практически была сходной ($42,58 \pm 3,50$ и $38,50 \pm 5,39$ г/л соответственно). В связи с отмеченными особенностями пассивные крысы данной группы имели более высокий показатель, характеризующий конформацию молекулы альбумина — ЭКА/ОКА — по сравнению с активными животными (на 40,0%, $p < 0,05$).

Свойства связывающих центров альбумина у крыс с разной поведенческой активностью в тесте «открытое поле»

У поведенчески активных крыс, подвергнутых стрессорной нагрузке, удельная флуоресценция (F/rSA) была выше, чем у интактных особей ($p < 0,05$). Противоположная картина наблюдалась у пассивных животных: после экспериментального стресса F/rSA была меньше, чем в контроле ($p < 0,05$; рис. 1).

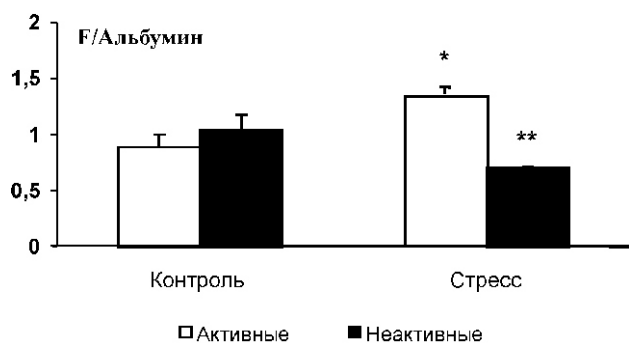


Рис. 1. Влияние острой стрессорной нагрузки на удельную интенсивность флуоресценции зонда CAPIDAN из альбумина у крыс с разной поведенческой активностью. По оси ординат: отношение интенсивности флуоресценции CAPIDAN (18 мкМ) к концентрации альбумина в выделенной альбуминовой фракции. * $p < 0,05$ по сравнению с активными крысами в контроле; ** $p < 0,05$ по сравнению с неактивными крысами в контроле.

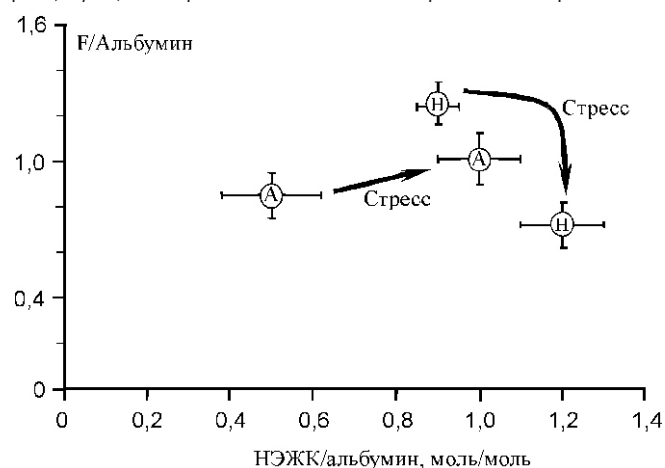


Рис. 2. Связь между уровнем НЭЖК в альбумине и удельной интенсивностью зонда CAPIDAN из сывороточного альбумина у активных («А») и неактивных («Н») крыс в контроле и при острой стрессорной нагрузке. По оси абсцисс: молярное отношение НЭЖК/альбумин, определенное в выделенной из сыворотки альбуминовой фракции. По оси ординат: отношение интенсивности флуоресценции CAPIDAN (18 мкМ) к концентрации альбумина в образце. Стрелки проведены от контрольных групп животных к группам, подвергнутым стрессорному воздействию.

В альбуминовой фракции сывороток крыс определяли концентрацию НЭЖК; в дальнейшем проведен сравнительный анализ молярного отношения НЭЖК/rSA с удельной флуоресценцией CAPIDAN из альбумина — величиной F/rSA. Установлено, что поведенчески активные крысы, прогностически устойчивые к развитию негативных последствий стресса, исходно характеризуются меньшими значениями НЭЖК/rSA и F/rSA. Следовательно, низкой интенсивности флуоресценции у этих животных соответствует меньшая «загруженность» альбумина жирными кислотами. У поведенчески пассивных крыс, прогностически предрасположенных к стрессорным нагрузкам, количество жирных кислот, связанных с альбумином, и относительная интенсивность флуоресценции CAPIDAN из альбумина были исходно больше, чем у активных особей (рис. 2).

Острое стрессорное воздействие оказывало различное влияние на альбуминовые центры у животных с разной чувствительностью к стрессу. В альбуминовой фракции у устойчивых крыс выявлено увеличение интенсивности флуоресценции зонда из альбумина, а также повышение содержания НЭЖК в rSA (на 100%; данные не представлены). У предрасположенных к стрессорной нагрузке животных наблюдалось некоторое уменьшение удельной флуоресценции зонда CAPIDAN при одновременном увеличении уровня НЭЖК в альбуминовой фракции (на 30%; данные не представлены).

В наших экспериментах статистически значимых различий содержания НЭЖК в сыворотке крови у пассивных и активных животных не выявлено. Уровень связанных с альбумином НЭЖК у активных в открытом поле крыс был существенно меньше, чем у пассивных особей. Сходные отличия выявлены для показателя, характеризующего «загрузку» молекулы альбумина жирными кислотами (рис. 2).

Влияние цитокинов на свойства связывающих центров альбумина крови у крыс с разной поведенческой активностью в тесте «открытое поле»

В настоящее время существуют доказательства, иллюстрирующие участие цитокинов в механизмах развития эмоционального стресса [12–18]. Состояние иммунных функций организма во многом определяется соотношением провоспалительных (интерлейкин-1 β [ИЛ-1 β], ИЛ-2, ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α и др.) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, трансформирующий ростовой фактор- β) [11]. Показано существование функционального антагонизма между цитокинами указанных типов [11, 14].

Отличительной функциональной особенностью противовоспалительного цитокина ИЛ-4 является регуляторное влияние не только на клеточные, но и на гуморальные иммунные процессы [11, 14, 25]. Провоспалительный цитокин ИЛ-1 β является главным медиатором развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма, стимулирует специфическое звено иммунитета [11, 26]. ИЛ-1 β вовлечен в развитие острой фазы стрессорной реакции, запускает каскад секреции других цитокинов в организме [11, 15, 27].

В специальной серии опытов мы исследовали влияние ИЛ-1 β и ИЛ-4 на свойства связывающих центров альбумина крови у крыс с разной поведенческой активностью в открытом поле. Как отмечено ранее, изначально отношение ЭКА к ОКА, отражающее связывающую способность этого белка, больше у пассивных особей [24]. Одна-

ко после внутрибрюшинного введения ИЛ-1 β и ИЛ-4 исходные межгрупповые различия связывающей способности молекулы сывороточного альбумина не выявлены, что обусловлено более выраженным увеличением этого показателя у активных животных (на 56,0 и 58,3% соответственно по сравнению с контролем; $p < 0,01$; рис. 3).

Экспериментальная стрессорная нагрузка на фоне предварительной инъекции изученных цитокинов не сопровождалась достоверными изменениями ЭКА/ОКА в сыворотке крови крыс (по сравнению с нестрессированными животными; рис. 4А-Б). Следовательно, ИЛ-1 β и ИЛ-4 снимают выявленные ранее постстрессорные изменения ЭКА/ОКА как у устойчивых, так и у предрасположенных к стрессу особей. При этом данное соотношение у контрольных и стрессированных крыс с разной поведенческой активностью в открытом поле «стабилизировалось» на одном уровне.

Выявленные эффекты цитокинов могут быть связаны с модификацией молекулы альбумина на фоне коррекции иммунного статуса организма. Следует подчеркнуть, что ИЛ-1 β и ИЛ-4 оказывали однонаправленное действие на свойства связывающих центров альбумина крови у животных с разными параметрами поведения.

Влияние олигопептидов на свойства связывающих центров альбумина крови у крыс с разной поведенческой активностью в тесте «открытое поле»

В специальной серии экспериментов исследовали изменение конформационных свойств молекулы альбумина под действием олигопептидов, повышающих устойчивость к эмоциональным стрессорным воздействиям — ПВДС и Семакса [19]. Внутрибрюшинное введение ПВДС уменьшало уровень ЭКА в сыворотке крови как у активных крыс, так и у пассивных животных. В то же время, данный олигопептид не оказывал значимого влияния на показатель ЭКА/ОКА по сравнению с контролем (данные не представлены).

Экспериментальная стрессорная нагрузка на фоне предварительного введения ПВДС не приводила к статистически достоверным изменениям ЭКА/ОКА в сыворотке крови крыс с разными параметрами поведения в тесте «открытое поле» (по сравнению с контролем; рис. 5А). Следовательно, ПВДС предупреждал вызываемое стрессорным воздействием снижение указанного показателя как у пассивных, так и у активных животных.

При изучении эффектов Семакса установлено, что препарат не влияет на отношение ЭКА/ОКА в крови интактных крыс с разной поведенческой активностью в открытом поле (по сравнению с контролем; данные не представлены). У пассивных особей, получавших физиологический раствор, после стрессорной нагрузки обнаружено уменьшение отношения ЭКА/ОКА по сравнению с таковым, у не стрессированных крыс (рис. 5). Однако на фоне инъекции Семакса стресс сопровождался уменьшением этого показателя у поведенчески активных ($p < 0,05$; рис. 5Б), но не у пассивных особей.

Обсуждение результатов

Проведенные исследования показали, что молекула альбумина изменяет конформацию в условиях экспериментального стресса по-разному, как при введении про- и противовоспалительных цитокинов, так и олигопептидов

(ПВДС и Семакса), повышающих устойчивость животных к отрицательным эмоциогенным нагрузкам.

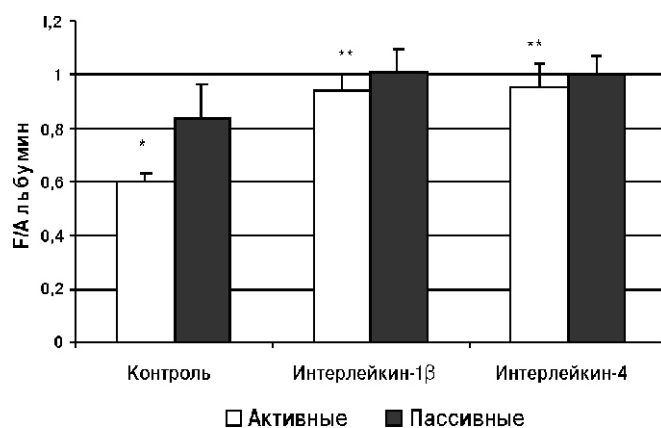


Рис. 3. Влияние ИЛ-1 β и ИЛ-4 на удельную интенсивность флуоресценции зонда CAPIDAN из альбумина у крыс с разной поведенческой активностью. По оси ординат: отношение интенсивности флуоресценции CAPIDAN (18 мкМ) к концентрации альбумина в выделенной альбуминовой фракции. * $p < 0,05$ по сравнению с пассивными крысами в контроле; ** $p < 0,01$ по сравнению с активными крысами в контроле.

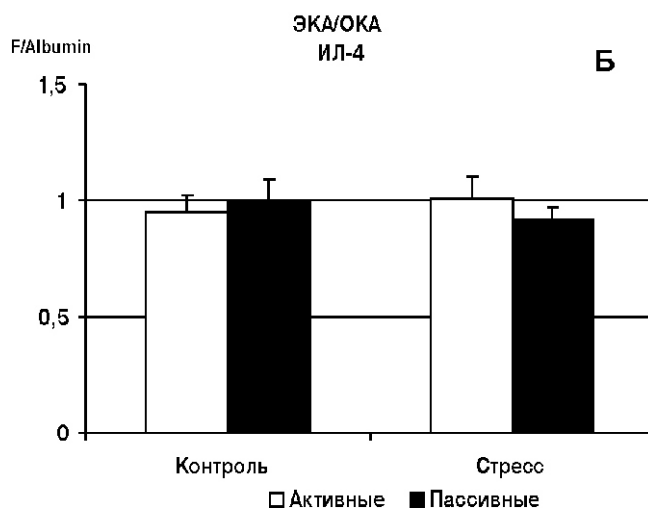
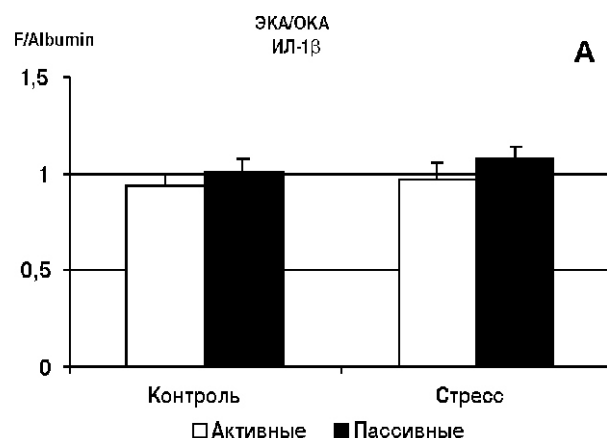


Рис. 4. Влияние ИЛ-1 β (А) и ИЛ-4 (Б) на удельную интенсивность флуоресценции зонда CAPIDAN из альбумина у крыс с разной поведенческой активностью при острой стрессорной нагрузке. По оси ординат: отношение интенсивности флуоресценции CAPIDAN (18 мкМ) к концентрации альбумина в выделенной альбуминовой фракции.

Крысы, проявляющие разную активность в открытом поле и имеющие разную прогностическую устойчивость к стрессорным воздействиям, отличаются по свойствам связывающих центров молекул альбумина. Установлено, что в исходном состоянии у поведенчески активных животных удельная флуоресценция, отнесенная к массе альбумина, ниже, чем у пассивных особей. Указанные особенности молекулы альбумина согласуются с обнаруженными в предыдущих опытах количественными различиями связывания альбумина с НЭЖК у особей с разными параметрами поведения [28].

Острая стрессорная нагрузка приводит к изменению свойств альбуминовых центров. Флуоресценция зонда CAPIDAN, как показатель состояния связывающих центров альбумина, в указанных условиях увеличивается у активных крыс, но уменьшается у пассивных животных. Данные различия в свойствах связывающих альбуминовых центров можно объяснить колебаниями уровня НЭЖК в альбумине.

Изменение взаимодействия зонд-альбумин могло явиться результатом конкуренции за места связывания зонда, например, в случае «загрузки» альбумина токсическими веществами при эндо- или экзотоксикозе. В наших экспериментах у крыс не было тяжелого эндотоксикоза или повреждения печени и почек. Поэтому можно полагать, что флуоресцентный зонд в молекуле альбумина реагировал, прежде всего, на конформационные изменения

альбумина [29, 30]. Одной из основных причин конформационных изменений молекулы альбумина при стрессе является, по всей вероятности, перенос альбумином НЭЖК. Связываясь с альбумином, НЭЖК оказывают такое влияние на его конформацию, что изменяется взаимодействие этого белка с другими лигандами (в частности, с использованным в работе флуоресцентным зондом).

Следует указать, что в механизмах формирования устойчивости организма к отрицательным последствиям стрессорных воздействий принимают участие и другие молекулы энергетического метаболизма, в том числе жирные кислоты и липиды. Известно, что стресс связан, помимо огромного числа биохимических и гормональных реакций, с липолизом липопротеинов жировой ткани вследствие адреналового выброса и освобождения жирных кислот [9, 31]. В крови жирные кислоты, главным образом насыщенные и моновенасыщенные, связываются с альбумином и транспортируются в ткани. Альбумин выполняет тем самым трофическую и защитную функции. Жирные кислоты служат энергетическим субстратом для мышц и миокарда. С другой стороны, жирные кислоты в не связанном с альбумином виде токсичны для клеток [31].

НЭЖК в сыворотке крови находятся в основном во фракции альбумина, но могут присутствовать и во фракции липопротеинов [31], в комплексе с другими специфическими переносчиками жирных кислот. Отсутствие достоверных отличий в содержании НЭЖК в сыворотке и альбуминовой фракции у пассивных крыс указывает на то, что основная масса НЭЖК в крови этих животных находится в альбумине. У поведенчески активных в открытом поле крыс только 50% НЭЖК сыворотки было связано с альбумином. Можно было ожидать, что у этих особей, прогностически устойчивых к стрессу, в крови больше липопротеинов, чем у пассивных животных. Таким образом, липопротеины конкурировали бы с альбумином за НЭЖК. Однако наши опыты показали, что уровень липопротеинов у активных крыс не превышал таковой у пассивных особей. По-видимому, оставшиеся 50% НЭЖК сыворотки у этих животных связываются липопротеинами и другими переносчиками жирных кислот.

Возможно, в исходном состоянии у поведенчески активных особей «занятость» связывающих центров молекулы альбумина эндогенными лигандами выше, чем у пассивных крыс. Следовательно, у активных животных формируется специфическая конформация сывороточного альбумина, что сопровождается уменьшением его способности к связыванию других лигандов (в нашей работе — зонда К-35).

Нами установлено, что предварительное введение регуляторных олигопептидов Семакса и ПВДС, модулирующих чувствительность к отрицательным последствиям эмоционального стресса, оказывает влияние на альбуминовые показатели крови. В частности, введение Семакса предупреждает конформационные изменения молекулы сывороточного альбумина (уменьшение отношения ЭКА/ОКА) у особей, прогностически предрасположенных к постстрессорным изменениям физиологических функций.

При исследовании влияния провоспалительного цитокина ИЛ-1-β и противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на альбуминовые показатели сыворотки крови выявлено уменьшение общей и эффективной концентрации сывороточного альбумина у крыс с разными параметрами поведения. Необходимо отметить, что под действием цитокинов ОКА и ЭКА уменьшались до одинаковых величин как у актив-

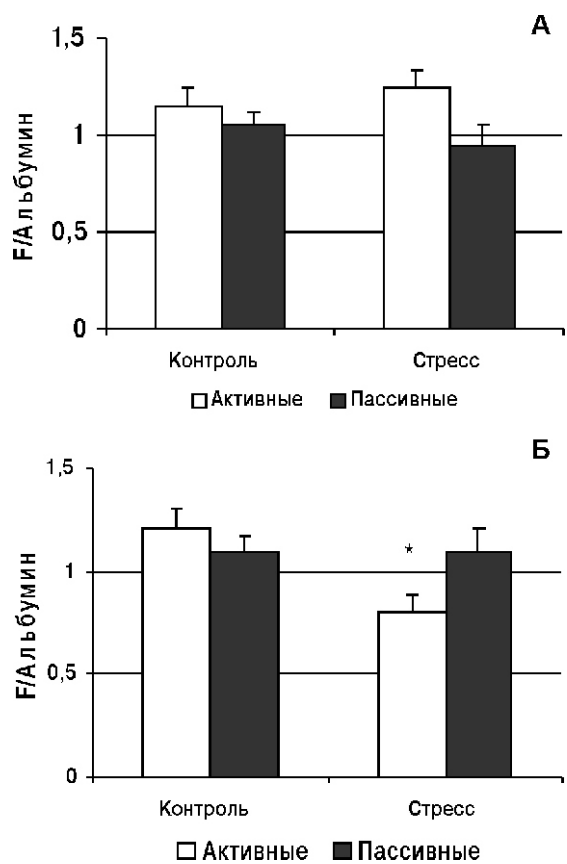


Рис. 5. Влияние ПВДС (А) и Семакса (Б) на удельную интенсивность флуоресценции зонда CAPIDAN из альбумина у крыс с разной поведенческой активностью при острой стрессорной нагрузке. По оси ординат: отношение интенсивности флуоресценции CAPIDAN (18 мкМ) к концентрации альбумина в выделенной альбуминовой фракции. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными особями.

ных, так и у пассивных животных. Одновременно в этих условиях отмечено увеличение отношения ЭКА/ОКА. Поскольку в исходных условиях активные особи характеризовались большим значением ОКА по сравнению с пассивными крысами, эффект интерлейкинов на эти показатели был более выражен у животных с высокой активностью в открытом поле. Возможно, введение изученных иммуномодуляторов сопровождается выходом сывороточного альбумина в ткани. В то же время, конформация молекулы альбумина сосудистого русла изменяется в сторону увеличения числа центров, способных к связыванию лигандов. Для уточнения процессов перераспределения альбуминового пула при изменении иммунного статуса необходимо проведение дополнительных исследований по определению содержания альбумина в сыворотке крови и тканях.

Обнаруженные сходные эффекты ИЛ-1 β и ИЛ-4 на альбуминовые показатели сыворотки крови дополняют результаты наших предыдущих опытов. Мы показали, что указанные цитокины оказывают однонаправленное действие на ряд физиологических показателей у крыс, в частности, на функциональное состояние органов-маркеров стресса [32]. Кроме этого, ИЛ-1 β и ИЛ-4 предупреждали изменения лейкоцитарных показателей периферической крови у животных, обнаруженные после стрессорной нагрузки [33, 34], что может быть обусловлено, в частности, общностью строения интерлейкинов и их рецепторов [11]. Возможно, изученные полипептидные молекулы сходным образом взаимодействуют со связывающими центрами альбумина, что сопровождается однотипными изменениями конформации молекулы белка.

Несмотря на уменьшение ОКА и ЭКА под влиянием данных иммуномодуляторов, наблюдалось увеличение связывающей способности этого белка. Более выраженные эффекты указанных интерлейкинов на альбуминовые показатели крови у поведенчески активных крыс по сравнению с пассивными особями связаны с различиями в ОКА, обнаруженными у этих животных в исходном состоянии. Кроме этого, выявленные особенности могут быть обусловлены спецификой метаболических процессов у животных с разной поведенческой активностью.

Список литературы

1. Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 1994; 45: 153-203.
2. Peters T.J. *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications.* San Diego: Academic Press; 1996. 452 p.
3. Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C.R., Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89(16): 7674-77.
4. Mook S., Halkes C.J., Bilecen S., Cabezas M.C. *In vivo* regulation of plasma free fatty acids in insulin resistance. *Metabolism.* 2004; 53(9): 1197-1201.
5. Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А., Смолина Н.В., Родоман Г.В., Узбеков М.Г. Альбуминовый флуоресцентный тест: результаты клинических исследований. *Эфферентная и физико-химическая медицина.* 2009; 1: 16-26.
6. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине.* М.: Ириус; 1994. 226 с.
7. Gryzunov Yu.A., Koplík E.V., Smolina N.V., Kopaeva L.B., Dobretsov G.E., Sudaikov K.V. The properties of binding sites of serum albumin in rats with various resistance to emotional stress loading. *Stress.* 2006; 9(1): 53-60.
8. Перцов С.С. Поведение крыс при смещении светового режима и введении мелатонина. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2005; 91(7): 802-9.
9. Судаков К.В. *Избранные труды. Том 3. Эмоции и эмоциональный стресс.* М.: НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН; 2012. 534 с.
10. Судаков К.В., Котов А.В., Перцов С.С. Экспериментальные подходы к индивидуальной медицине: зависимость эффектов фармакологического воздействия от характера поведения животных. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2004; 1: 51-7.
11. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины.* СПб: Фолиант; 2008. 552 с.
12. Перцов С.С., Коплик Е.В., Симбирцев А.С., Калининко Л.С. Влияние интерлейкина-1 β на поведение крыс в условиях слабой стрессорной нагрузки при тестировании в открытом поле. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2009; 148(11): 488-90.
13. Перцов С.С., Калининко Л.С., Коплик Е.В., Алексеева И.В., Кирбаева Н.В., Шаранова Н.Э., Васильев А.В. Динамика концентрации цитокинов в крови крыс с разными поведенческими характеристиками после острой стрессорной нагрузки. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2015; 101(9): 1032-41.
14. Doi H., Nishida A., Yorimitsu M., Komiyama T., Kadota Y., Tetsunaga T., Yoshida A., Kubota S., Takigawa M., Ozaki T. Interleukin-4 downregulates the cyclic tensile stress-induced matrix metalloproteinases-13 and cathepsin B expression by rat normal chondrocytes. *Acta Med. Okayama.* 2008; 62(2): 119-26.
15. Gadek-Michalska A., Bugajski A.J., Bugajski J. Prostaglandins and interleukin-1-beta in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic phenylephrine under basal and stress conditions. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 59(3): 563-75.
16. Khansari A.R., Parra D., Reyes-Lopez F.E., Tort L. Cytokine modulation by stress hormones and antagonist specific hormonal inhibition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) head kidney primary cell culture. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017; 250: 122-35.
17. Pertsov S.S., Koplík E.V., Stepanyuk V.L., Simbirteev A.S. Blood cytokines in rats with various behavioral characteristics during emotional stress and treatment with interleukin- β . *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009; 148(2): 196-9.
18. Won E., Kim Y.K. Stress, the autonomic nervous system, and the immune-kynurenine pathway in the etiology of depression. *Curr. Neuropharmacol.* 2016; 14(7): 665-73.
19. Sudaikov K.V., Umriukhin P.E., Koplík E.V., Anokhin K.V. Delta-sleep inducing peptide (DSIP) and ACTH (4-10) analogue influence fos-induction in the limbic structures of the rat brain under emotional stress. *Stress.* 2001; 4(2): 143-53.
20. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу. *Вестник новых медицинских технологий.* 2002; 9(1): 16-18.
21. Перцов С.С., Григорчук О.С., Коплик Е.В., Абрамова А.Ю., Чекмарева Н.Ю., Чехлов В.В. Состояние органов-маркеров стресса у крыс с разной поведенческой активностью при многократных стрессорных воздействиях. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 160(7): 25-9.
22. Vasileva R., Jakab M., Hasko F. Application of ion-exchange chromatography for the production of human albumin. *J. Chromatogr.* 1981; 216: 279-84.
23. Matsubara C., Nishikawa Y., Yoshida Y., Takamura K. A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase. *Anal Biochem.* 1983; 130(1): 128-33.
24. Перцов С.С., Коплик Е.В., Калининко Л.С., Смолина Н.В. Действие интерлейкина-1 β и интерлейкина-4 на альбуминовые показатели крови у крыс с разной поведенческой активностью. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2011; 97(3): 276-82.
25. Paul W.E. History of interleukin-4. *Cytokine.* 2015; 75(1): 3-7.
26. Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013; 39(6): 1003-18.
27. Cohen P. The TLR and IL-1 signalling network at a glance. *J. Cell Sci.* 2014; 127(11): 2383-90.
28. Коплик Е.В., Грызунов Ю.А., Копеева Л.Б., Добрецов Г.Е., Судаков К.В. Уровень неэстерифицированных жирных кислот в альбуминовой фракции сыворотки крови у крыс с различной двигательной активностью в тесте «Открытое поле». *Доклады академии наук.* 2001; 378(1): 124-6.
29. Лопухин Ю.М., Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А. Конформационные изменения молекулы альбумина: новый тип реакции на патологический процесс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2000; 130(7): 4-9.
30. Smolina N.V., Gryzunov Y.A., Maximova N.M., Dobretsov G.E., Uzbekov M.G., Misionzhnik E.Y., Vertogradova O.P. Characteristics of albumin molecule binding centers in patients with anxious depression. Study by the fluorescence quenching method. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; 144(5): 674-676.
31. Титов В.Н. Альбумин, транспорт насыщенных жирных кислот и метаболический стресс-синдром. *Клиническая лабораторная диагностика.* 1999; 4: 3-11.
32. Перцов С.С., Коплик Е.В., Калининко Л.С. Сравнительный анализ действия цитокинов на состояние тимуса, надпочечников и селезенки у крыс с разными поведенческими характеристиками. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2010; 150(9): 244-7.

33. Коплик Е.В., Перцов С.С., Калиниченко Л.С. Воздействие интерлейкина-1 β на лейкоцитарные показатели периферической крови при острой стрессорной нагрузке у крыс с разными поведенческими характеристиками. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156(10): 419-425.

34. Перцов С.С., Коплик Е.В., Калиниченко Л.С. Влияние ИЛ-4 на лейкоцитарные показатели периферической крови у крыс с разными характеристиками поведения при остром стрессорном воздействии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 158(11): 539-44.

References

1. Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 1994; 45: 153-203.

2. Peters T.J. *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. San Diego: Academic Press; 1996. 452 p.

3. Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C.R., Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89(16): 7674-77.

4. Mook S., Halkes C.J., Bilecen S., Cabezas M.C. *In vivo* regulation of plasma free fatty acids in insulin resistance. *Metabolism*. 2004; 53(9): 1197-1201.

5. Dobretsov G.E., Gryzunov Yu.A., Smolina N.V., Rodoman G.V., Uzbekov M.G. Albumin fluorescent test: results of clinical studies. *Efferentnaya i Fiziko-Khimicheskaya Meditsina*. 2009; 1: 16-26. (in Russian)

6. Gryzunov Y.A., Dobretsov G.E. *Blood serum albumin in clinical medicine*. Moscow: Irius; 1994. 226 p. (in Russian)

7. Gryzunov Yu.A., Koplík E.V., Smolina N.V., Kopaeva L.B., Dobretsov G.E., Sudakov K.V. The properties of binding sites of serum albumin in rats with various resistance to emotional stress loading. *Stress*. 2006; 9(1): 53-60.

8. Pertsov S.S. Behavior of rats kept under conditions of a shifted light/dark regimen and receiving melatonin. *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Im. I.M. Sechenova*. 2005; 91(7): 802-9. (in Russian)

9. Sudakov K.V. *Selected texts. Volume 3. Emotions and emotional stress*. Moscow: P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, RAMS; 2012. 534 p. (in Russian)

10. Sudakov K.V., Kotov A.V., Pertsov S.S. Experimental approaches to individual medicine: dependence of the effects of pharmacological treatment on the behavior of animals. *Vestnik Ural'skoy Meditsinskoy Akademicheskoy Nauki*. 2004; 1: 51-7. (in Russian)

11. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines*. SPb: Foliant; 2008. 552 p. (in Russian)

12. Pertsov S.S., Koplík E.V., Simbirtsev A.S., Kalinichenko L.S. Effect of interleukin-1 β on the behavior of rats during mild stress in the open-field test. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2009; 148(11): 488-90. (in Russian)

13. Pertsov S.S., Kalinichenko L.S., Koplík E.V., Alekseeva I.V., Kirbaeva N.V., Sharanova N.E., Vasil'ev A.V. Dynamics of cytokine concentration in the blood of rats with various behavioral characteristics after acute emotional stress. *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Im. I.M. Sechenova*. 2015; 101(9): 1032-41. (in Russian)

14. Doi H., Nishida K., Yorimitsu M., Komiyama T., Kadota Y., Tetsunaga T., Yoshida A., Kubota S., Takigawa M., Ozaki T. Interleukin-4 downregulates the cyclic tensile stress-induced matrix metalloproteinases-13 and cathepsin B expression by rat normal chondrocytes. *Acta Med. Okayama*. 2008; 62(2): 119-26.

15. Gadek-Michalska A., Bugajski A.J., Bugajski J. Prostaglandins and interleukin-1 β in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic phenylephrine under basal and stress conditions. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 59(3): 563-75.

16. Khansari A.R., Parra D., Reyes-Lopez F.E., Tort L. Cytokine modulation by stress hormones and antagonist specific hormonal inhibition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream

(*Sparus aurata*) head kidney primary cell culture. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017; 250: 122-35.

17. Pertsov S.S., Koplík E.V., Stepanyuk V.L., Simbirtsev A.S. Blood cytokines in rats with various behavioral characteristics during emotional stress and treatment with interleukin- β . *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009; 148(2): 196-9.

18. Won E., Kim Y.K. Stress, the autonomic nervous system, and the immune-kynurenine pathway in the etiology of depression. *Curr. Neuropharmacol.* 2016; 14(7): 665-73.

19. Sudakov K.V., Umriukhin P.E., Koplík E.V., Anokhin K.V. Delta-sleep inducing peptide (DSIP) and ACTH (4-10) analogue influence fos-induction in the limbic structures of the rat brain under emotional stress. *Stress*. 2001; 4(2): 143-53.

20. Koplík E.V. Method to evaluate the criterion for rat's resistance to emotional stress. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologiy*. 2002; 9(1): 16-18. (in Russian)

21. Pertsov S.S., Grigorichuk O.S., Koplík E.V., Abramova A.Yu., Chekmareva N.Yu., Chekhlov V.V. State of stress-marker organs in rats with various behavioral characteristics during repeated stress exposures. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2015; 160(7): 25-29. (in Russian)

22. Vasileva R., Jakab M., Hasko F. Application of ion-exchange chromatography for the production of human albumin. *J. Chromatogr.* 1981; 216: 279-84.

23. Matsubara C., Nishikawa Y., Yoshida Y., Takamura K. A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase. *Anal Biochem.* 1983; 130(1): 128-33.

24. Pertsov S.S., Koplík E.V., Kalinichenko L.S., Smolina N.V. Effect of interleukin-1 β and interleukin-4 on serum albumin parameters in rats with various behavioural characteristics. *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Im. I.M. Sechenova*. 2011; 97(3): 276-82. (in Russian)

25. Paul W.E. History of interleukin-4. *Cytokine*. 2015; 75(1): 3-7.

26. Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013; 39(6): 1003-18.

27. Cohen P. The TLR and IL-1 signalling network at a glance. *J. Cell. Sci.* 2014; 127(11): 2383-90.

28. Koplík E.V., Gryzunov Yu.A., Kopaeva L.B., Dobretsov G.E., Sudakov K.V. Level of nonesterified fatty acids in the albumin fraction of blood serum from rats with different behavioral activity in the open-field test. *Doklady Akademii Nauk*. 2001; 378(1): 124-6. (in Russian)

29. Lopukhin Yu.M., Dobretsov G.E., Gryzunov Yu.A. Conformational changes in albumin molecule: A new response to pathological process. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2000; 130(7): 4-9. (in Russian)

30. Smolina N.V., Gryzunov Y.A., Maximova N.M., Dobretsov G.E., Uzbekov M.G., Misionzhnik E.Y., Vertogradova O.P. Characteristics of albumin molecule binding centers in patients with anxiety depression. Study by the fluorescence quenching method. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; 144(5): 674-6.

31. Titov V.N. Albumin, transport of saturated fatty acids, and metabolic stress-syndrome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 1999; 4: 3-11. (in Russian)

32. Pertsov S.S., Koplík E.V., Kalinichenko L.S. Comparative analysis of the effect of cytokines on the thymus, adrenal glands, and spleen in rats with various behavioral characteristics. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2010; 150(9): 244-7. (in Russian)

33. Koplík E.V., Pertsov S.S., Kalinichenko L.S. Effect of interleukin-1 β on peripheral blood leukocytes in rats with various behavioral characteristics during acute stress. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2013; 156(10): 419-425. (in Russian)

34. Pertsov S.S., Koplík E.V., Kalinichenko L.S. Effect of interleukin-4 on peripheral blood leukocytes in rats with various behavioral characteristics during acute stress. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2014; 158(11): 539-44. (in Russian)

Сведения об авторах:

Перцов Сергей Сергеевич (Pertsov S.S.), доктор мед. наук, член-корр. РАН, профессор, зам. директора по научной работе, e-mail: s.pertsov@mail.ru

Коплик Елена Владимировна (Koplík E.V.), канд. мед. наук, вед. научн. сотр., e-mail: e.koplík@mail.ru

Смолина Наталья Викторовна (Smolina N.V.), канд. биол. наук, ст. научн. сотр., e-mail: esmolina@mail.ru

Information about authors:

Pertsov S.S. <http://orcid.org/0000-0001-5530-4990>