

© Фоменко І.С.

УДК 612.014.484+616.348-002):612.015.11:615.346]-08

Фоменко І.С.

## РОЛЬ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ У ФОРМУВАННІ ВИРАЗКОВИХ УШКОДЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПРИ РІЗНИХ МОДЕЛЯХ СТРЕСУ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

biochemistry@meta.ua

Дана робота є фрагментом НДР «Клініко-експериментальне обґрунтування моніторингу, діагностики та стандартизованих методів лікування метаболічних захворювань внутрішніх органів та їх ускладнень», № держ. реєстрації 0110U001641.

**Вступ.** Одним із найпотужніших чинників розвитку деструктивних ушкоджень органів травної системи є стрес [5, 6, 13, 16]. Його ульцерогенний вплив носить комплексний характер і здійснюється на різних рівнях: від центральних відділів ЦНС та системи гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз до клітинного та молекулярного рівнів [6, 8, 9, 17]. Серед органів травної системи найбільш виражений деструктивний вплив стрес чинить в слизовій оболонці шлунка, зумовлюючи формування виразкових утворень. В слизовій оболонці товстої кишки стрес (СОТК) також є одним з ключових чинників, який може викликати розвиток виразкового коліту у експериментальних тварин та людей [6, 14]. Стресовий вплив супроводжується посиленням інфільтрації СОТК лейкоцитами, порушення моторики кишки та мікробіоценозу [15]. Одним із найважливіших чинників при стресі є посилення оксидативно-нітративних реакцій, тому дослідження стану процесів ліпопероксидації та активності ферментів антиоксидантного захисту є актуальним.

**Мета роботи** – провести порівняльний аналіз гістологічних змін та показників ліпопероксидації в СОТК за умов впливу стресу різного ґенезу: водно-іммобілізаційного (ВІС) тривалістю 3,5 та 5 год і адреналін-індукованого (АІС).

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження виконано на 40 щурах – самцях масою 200-220 г згідно з міжнародними умовами проведення експериментів з лабораторними тваринами. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

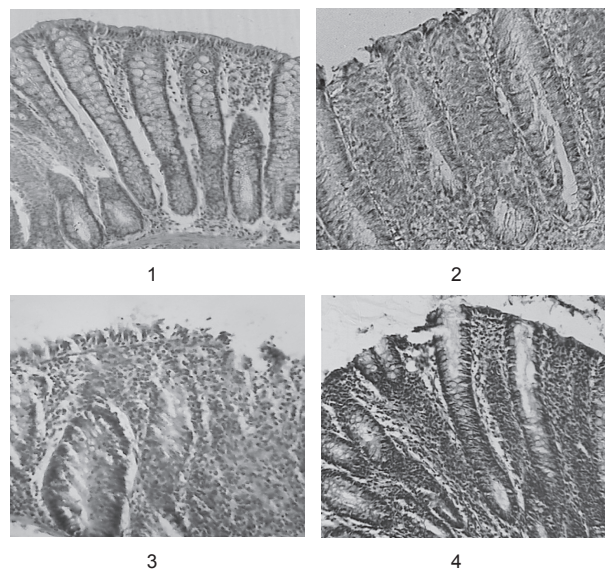
Щурів утримували на стандартному раціоні віварію, для проведення досліду тварин брали натще, забезпечували безперешкодний доступ до води.

Тварин було розподілено на 4 групи, що включали: 1) контрольну групу; 2) тварини, у яких моделювали ВІС – тварин для іммобілізації поміщали в пластикові патрони з зануренням у воду, до рівня яремної ямки щура при температурі води 23°C упродовж 3,5 год; 3) час експозиції ВІС було продовжено до 5 год; 4) тварини, у яких моделювали АІС шляхом

інтраперитонеальним введенням адреналіну (у дозі 2 мг/кг) [13]. Гістологічний матеріал фіксували у 10 % забуференому розчині формаліну. Подальша обробка матеріалу: заливання парафіном та виготовлення зрізів була проведена за загальноприйнятою методикою [1]. Препарати зрізів СОШ та СОТК фарбували гематоксиліном та еозином (ГЕ). Дослідження препаратів проводили за допомогою мікроскопа Olympus BX 41 при збільшенні ґ 300. Для оцінки розвитку стресу в сироватці крові визначали концентрацію кортизолу методом імуноферментного аналізу з використанням набору «Кортизол-ІФА», ООО «Хема». Інтенсивність процесів ліпопероксидації оцінювали на основі вмісту продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) за методом Р.А. Тимирбулатова та Е.И. Селезнева [3]. В гомогенатах СОТК також визначали активність мієлопероксидази [7], супероксиддисмутази [4] та каталази [2].

Результати оброблено з використанням пакету Statistika 7,0 ANOVA з апостеріорним попарним порівнянням груп.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Проведені нами дослідження не виявили деструктивних макроскопічних змін поверхні СОТК, як при ВІС тривалістю 3,5 год чи 5 год, так і за умов АІС. Проте гістологічними дослідженнями показані ознаки запального



**Рис. 1.** Гістологічні зміни в СОТК за умов норми та при АІС і ВІС різної тривалості (ґ 300):  
1 – контрольна група тварин; 2 – ВІС упродовж 3,5 год;  
3 – ВІС упродовж 5 год; 4- АІС.

стану в ділянках СОТК. Так, було зафіксовано інфільтрацію слизової оболонки поліморфноядерними лейкоцитами та лімфоцитами вже при 3,5 год ВІС. Подовження часу експозиції зумовлює появу ерозій та порушення слизового бар'єру АІС спричинював розвиток дифузного набряку, порушення цілісності епітеліального бар'єру і десквамацію епітеліоцитів, інфільтрацію лейкоцитами (рис. 1).

Враховуючи те, що стрес характеризується активацією симпато-адреналової системи з подальшим виділенням не лише адреналіну, але й кортизолу [10, 11], моделювання стресу в наших дослідженнях контролювали шляхом вимірювання рівня цього «стрес-гормону» в плазмі крові. За умов норми концентрація останнього становила  $60,8 \pm 1,3$  нмоль/л, тоді як при 3,5 год стресі вона зростала на 48 % ( $p < 0,01$ ), залишаючись приблизно на одному рівні і за умов дії ВІС тривалістю 5 год. АІС практично не змінював концентрацію кортизолу (рис. 2).

Отже, зміни рівня кортизолу в крові за умов моделювання різних видів стресу (ВІС та АІС) мали свої особливості: за умов ВІС концентрація кортизолу різко зростала і залишалась на високому рівні протягом 5 год. Водночас дія адреналіну не викликала зростання кортизолу, що має значення для інтерпретації даних, враховуючи той факт, що глюкокортикоїди і кортизол, зокрема, володіє гастропротективними властивостями [10-12].

Активність мієлопероксидази суттєво зростала у відповідь на дію чинників стресу: на 91 % при ВІС тривалістю 3,5 год, на 139 % при ВІС упродовж 5 год та в 5,6 разів при АІС,  $p < 0,01$  (3 – А), при цьому, як вже було описано вище, макроскопічно деструктивних змін СОТК

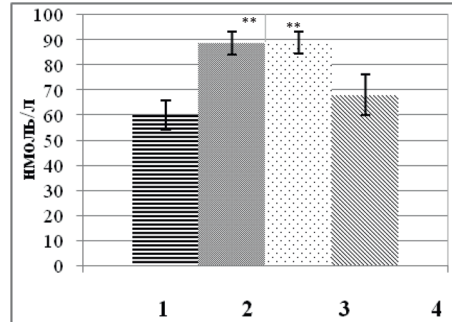


Рис. 2. Концентрація кортизолу в сироватці крові щурів за умов норми та при АІС і ВІС різної тривалості:

1 – контрольна група тварин; 2 – ВІС упродовж 3,5 год; 3 – ВІС упродовж 5 год; 4 – АІС.

Примітка: \*\* -  $P < 0,01$  порівняно з показниками тварин контрольної групи.

при не спостерігалось. Підвищення активності мієлопероксидази в СОТК за умов різних видів стресу свідчить з одного боку, про зростання проникності гемокapілярів до лейкоцитів, їх активацію, а з іншого боку про підвищення продукції гіпохлориту та посилене утворення активних форм кисню, за участі нейтрофілів. Усе перелічені чинники беруть участь в розвитку деструктивних процесів в СОТК.

Як при дії ВІС різної тривалості експозиції, так і за умов АІС у гомогенатах СОТК достовірно зростали показники вмісту ТБК-активних продуктів. У інтактних щурів концентрація ТБК-активних продуктів становила  $240,7 \pm 5,0$  мкмоль, при ВІС упродовж 3,5 год вона зростала на 13 % ( $p < 0,01$ ) і становила  $271,3 \pm 5,5$  мкмоль/г, при ВІС тривалістю 5 год збільшувалась на 15 % ( $p < 0,01$ ) –  $277,4 \pm 6,0$  мкмоль/г. Проте найвищого рівня вона сягала при АІС і становила  $332,1 \pm 8,1$  мкмоль/г, що було на 38 % вище, ніж у інтактних тварин (рис. 3 – В).

Описані зміни вмісту ТБК-активних продуктів засвідчують зростання інтенсивності окисдатовно-нітративних процесів та, імовірно, відіграють одну з ключових ролей в розвитку деструктивних ушкоджень в СОТК, що може призвести до виразкового коліту. Як видно з рис. 3, зміни активності мієлопероксидази та концентрації ТБК-активних продуктів є паралельними і корелюють між собою. Зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації при стресі супроводжувалось значними змінами активності ферментів антиоксидантного захисту СОД і каталази (рис. 4).

Так активність СОД зростала на 85 %,  $P < 0,01$  при 3 год ВІС, проте вже на 5,5 год ВІС знижувалась до  $34,94 \pm 9,23$

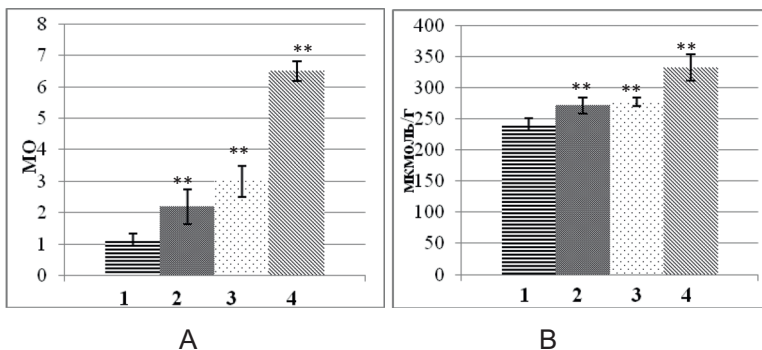


Рис. 3. Активність мієлопероксидази (А) та концентрація ТБК-активних продуктів в гомогенатах СОТК за умов норми та при АІС і ВІС різної тривалості:

1 – контрольна група тварин; 2 – ВІС упродовж 3,5 год; 3 – ВІС упродовж 5 год; 4 – АІС.

Примітка: \*\* –  $P < 0,01$  - порівняно з показниками у тварин контрольної групи.

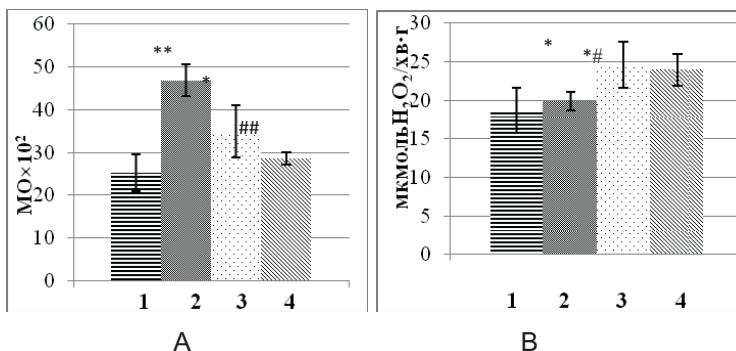


Рис. 4. Активність СОД (А) та каталази (В) в гомогенатах СОТК за умов норми та при АІС і ВІС різної тривалості: 1 – контрольна група тварин; 2 – ВІС упродовж 3,5 год; 3 – ВІС упродовж 5 год; 4- АІС.

Примітка: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  порівняно з показниками у тварин контрольної групи; # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$  порівняно з показниками при ВІС тривалістю 3,5 год.

МОС10<sup>2</sup> (рис. 4 – А). АІС призводив до незначного зростання рівня активності СОД. Зростання активності СОД при ВІС супроводжувалося підвищенням активності каталази, котра проявляла тенденцію до зростання (на 7 % при ВІС тривалістю 3,5 год, її активність підвищувалась на 48 % при ВІС упродовж 5 год ( $p \leq 0,05$ ). За умов АІС активність зростала на 47 % ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 4 – В). Отже, зміни активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД і каталази) залежить від тривалості та виду стресу. За умов відносно короткочасної дії стресу у першу чергу зростає рівень активності СОД, тоді як активність каталази змінюється недостовірно. Продовження тривалості часу дії стресу викликає зниження активності СОД та підвищення рівня активності каталази.

Відзначені зміни активності СОД та каталази пов'язані з рівнем продукції супероксидного радикалу,

синтез якого зростає за умов стресу, а також регуляцією експресії відповідних генів та наявністю субстратів та інгібіторів.

**Висновки.** Моделювання стресу не призводило до формування видимих деструктивних змін на поверхні СОТК, проте гістологічні дослідження засвідчили ознаки запального стану в СОТК при стресі різної тривалості та виду. Як при ВІС упродовж 5 год, так і при АІС внаслідок активації оксидативних процесів підвищувалась інтенсивність процесів ліпопероксидації, зростала активність мієлопероксидази, знижувалась активність СОД та зростала каталази. Такий стан, імовірно, сприяє розвитку запальних ушкоджень та викликає порушення функцій товстої кишки.

**Перспективи подальших досліджень.** З'ясувати механізми впливу поєданого впливу стресу та нестероїдних протизапальних засобів в СОТК.

### Література

1. Будзак І.Я. Функціонально-морфологічні зміни слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки при ерозіях гастродуоденальної зони, асоційованих з пілоричним хелікобактеріозом, та їх лікування : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.02 «Внутрішні хвороби» / І.Я. Будзак. – Сімферополь, 2002. – 19 с.
2. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторное дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.
3. Тимурбулатов М.А. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / М.А. Тимурбулатов, Е.И. Селезнев // Лабораторное дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
4. Чеварі С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте / С. Чеварі, Т.Д. Андял, Д. Штиренгер // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С. 9-13.
5. Alhazzani W. Stress ulcer prophylaxis in critically ill patients: review of the evidence / W. Alhazzani, M. Alshahrani, P. Moayyedi, R. Jaeschke // *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*. – 2012. – № 3. – P. 107-114.
6. Bhatia V. Stress and the gastrointestinal tract / V. Bhatia, R. Tandon // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 2005. – № 20. – P. 332-339.
7. Bradley P. P. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation / P. P. Bradley, R. D. Christensen, G. Rothstein // *Blood*. -1982. - № 60. – P. 618-622.
8. De Palma G. The Microbiota-Gut-Brain axis in gastrointestinal disorders: Stressed bugs, stressed brain or both? / G. De Palma, S.M. Collins, P. Bercik, E.F. Verdu // *J. Physiol.* - 2014. – Vol. 592, № 14. – P. 2989-2997.
9. Guo Sh. Gastric mucosal damage in water immersion stress: Mechanism and prevention with GHRP-6 / Sh. Guo, Q. Gao, Q. Jiao [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 18, № 24. – P. 3145–3155.
10. Filaretova L. Gastroprotective role of glucocorticoids during NSAID-induced gastropathy / L. Filaretova // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19. – P. 29-33.
11. Filaretova L. Stress and the stomach: corticotropin-releasing factor may protect the gastric mucosa in stress through involvement of glucocorticoids / L. Filaretova, T. Bagaeva, O. Morozova / *J. Physiol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 63. – P. 143-153.
12. Filaretova L. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones / L. Filaretova, T. Podvigina, T. Bagaeva, P. Bobryshev, K. Takeuchi // *J. Pharmacol. Sci.* – 2007. – Vol. 104. – P. 195-201.
13. Filaretova L. Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats / L.P. Filaretova, A.A. Filaretov, G.B. Makara // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274, № 6. - P. 1024-1130.
14. Fomenko I. Effects Of Conventional And Hydrogen Sulfide-Releasing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs In Rats With Stress-Induced And Epinephrine-Induced Gastric Damage / I. Fomenko, A. Sklyarov, T. Bondarchuk, L. Biletska, N. Panasyuk, J. L. Wallace // *Stress*. – 2014, Vol. 17, № 6. – P. 528-537.
15. Israeli E. The effect of restraint stress on the normal colon and on intestinal inflammation in a model of experimental colitis / E. Israeli, T. Hershcovici, E. Berenshtein [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2008. – Vol. 53, № 1. - P. 88-94.
16. Konturek P.C. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options / P.C. Konturek, T. Brzozowski, S.J. Konturek // *Journal of physiology and pharmacology*. – 2011. – Vol. 62, № 6. – P. 591-599.
17. Monnig A.A. A review of stress-related mucosal disease / A.A. Monnig, J.E. Prittie // *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. – 2011. – Vol. 21, № 5. – P. 484-495.
18. Мцннікес Н. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity / Н. Мцннікес, J.J. Tebbe, M. Hildebrandt [et al.] // *Dig Dis*. – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 201-211.

УДК 612.014.484+616.348-002:612.015.11:615.346]-08

### РОЛЬ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ У ФОРМУВАННІ ВИРАЗКОВИХ УШКОДЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПРИ РІЗНИХ МОДЕЛЯХ СТРЕСУ

Фоменко І.С.

**Резюме.** В досліджах на білих лабораторних щурах, яким модельовано водно-імобілізаційний стрес різної експозиції та адреналін-індукований стрес, проведено визначення рівня ТБК-активних продуктів, активності мієлопероксидази, супероксиддисмутази та каталази в слизовій оболонці товстої кишки щурів. З'ясовано, що,

незважаючи на відсутність деструктивних ушкоджень у товстій кишці, стрес різного ґенезу зумовив суттєві зміни біохімічних показників: зростання активності мієлопероксидази та концентрації ТБК-активних продуктів, значні коливання активності ферментів антиоксидантного захисту. Для більшості досліджуваних показників найбільш виражені зміни мали місце при моделі АІС (концентрація ТБК-активних продуктів зростала на 38%, активність мієлопероксидази в 5,6 разів,  $p < 0,01$ ). Отримані результати свідчать, що посилення оксидативних реакцій створює передумови для розвитку деструктивних ушкоджень слизової оболонки товстої кишки.

**Ключові слова:** стрес, ліпопероксидація, антиоксидантний захист, слизова оболонка товстої кишки.

УДК 612.014.484+616.348-002):612.015.11:615.346]-08

### **РОЛЬ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ ЯЗВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ СТРЕССА**

**Фоменко И.С.**

**Резюме.** В экспериментах на белых лабораторных крысах, которым моделировали водно-иммобилизационный стресс разной экспозиции и адреналин-индуцированный стресс, проведено определение уровня ТБК-активных продуктов, активности миелопероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы в слизистой оболочке толстой кишки крыс. Показано, что, несмотря на отсутствие деструктивных повреждений в толстой кишке, стресс различного генеза привел к развитию существенных изменений биохимических показателей: возрастание активности миелопероксидазы и концентрации ТБК-активных продуктов, существенные колебания активности ферментов антиоксидантной защиты. Для большинства исследуемых показателей наиболее выраженные изменения сопровождали модель адреналин-индуцированного стресса (концентрация ТБК-активных продуктов возрастала на 38 %, активность миелопероксидазы в 5,6 раз,  $p < 0,01$ ). Полученные результаты показывают, что усиление оксидативных реакций создает предпосылки для развития деструктивных изменений слизистой оболочки толстой кишки.

**Ключевые слова:** стресс, липопероксидация, антиоксидантная защита, слизистая оболочка толстой кишки.

UDC 612.014.484+616.348-002):612.015.11:615.346]-08

### **The role of Lipid Peroxidation Processes in the Formation of Ulcerogenic Lesions of Colonic Mucosa under Conditions of Different Stress Models**

**Fomenko I.**

**Abstract.** Stress is one of the most common reasons of the development of destructive lesions in digestive system. Ulcerogenic action of stress in colonic mucosa is accompanied by the leukocytes infiltration, changes in gut motor function and disbiosis. The intensification of oxidative and nitrative reactions is one of the most important factors of ulcerogenesis in colonic mucosa under conditions of acute and chronic stress.

The aim of the study was to compare histological changes and biochemical parameters of lipid peroxidation in colonic mucosa under condition of stress: water-immersion restraint of different duration (3.5 and 5 hours) and epinephrine-induced stress.

The structure of this study and the experimental procedures performed on the animals were approved by the Ethical Committee of Lviv National Medical University. The experimental procedures were carried out in accordance with international guidelines for the use and care of laboratory animals. Male, outbred albino rats weighing 200-220g were used. Animals were divided into 4 groups: 1) control group; 2) rats were restrained in wire cages and immersed up to the depth of the xiphoid in a water bath (23°C) for 3.5 hours to induce gastric mucosal lesions, as described by Takagi et al. 3) time of water restraint stress duration was prolonged up to 5 hours; 4) epinephrine was administered to rats of the fourth group by intraperitoneally at a dose 2 mg/kg and twenty-four hours later the animals were sacrificed. Histological and biochemical investigations were performed in colonic mucosa. Intensity of lipid peroxidation was evaluated on the basis of malonic dialdehyde measurement. Activities of myeloperoxidase and superoxide dismutase were detected. The concentration of cortisol in blood serum was measured to prove the development of stress.

It was shown that stress of different genesis caused considerable changes in biochemical parameters however it didn't cause any destructive lesions in colonic mucosa. Histological analysis shows leukocytes infiltration under conditions of different types of stress.

The cortisol level in blood serum considerably increased under conditions of 3.5 hours water restraint stress and remained high in case of the prolongation of its duration up to 5 hours.

Among changes the most considerable ones were detected under the condition of epinephrine-induced stress: the increase of myeloperoxidase activity 5,6 folds ( $p < 0,01$ ) and malonic dialdehyde concentration by 38 % ( $p < 0,01$ ), changes in activities of enzymes antioxidant protection system. Changes of the most studied biochemical indices were more considerable under condition of 5 hours water restraint stress, as compared to 3.5 hours of duration. Myeloperoxidase activity increased by 113 % ( $p < 0,01$ ), malonic dialdehyde concentration by 15 %. However superoxide dismutase activity was higher in group of water restraint stress 3.5 hours duration as compared to other studied types of stress.

Obtained results suggest that intensification of oxidative reactions under conditions of stress makes conditions for the development of destructive changes of colonic mucosa which may lead to ulcerative colitis.

**Keywords:** stress, lipid peroxidation, antioxidant protection, colonic mucosa.

*Рецензент – проф. Непорада К.С.*

*Стаття надійшла 02.06.2015 р.*