

---

# ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 61:57

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014

*К. М.Ігрунова, І. С.Зозуля, Д. В.Ватліцов,  
Н. В.Русецька, В. В.Андріяш*

## **ВИВЧЕННЯ ЗМІН КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ МОНОНУКЛЕАРІВ ОБУМОВЛЕНОЇ СТРЕСОМ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ** **Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ**

Одним з найважливіших напрямків сучасних медичних досліджень є моделювання процесів життєдіяльності.

**Метою** даної роботи було вивчення впливу стресу різного генезу та тривалості на показники клітинної загибелі мононуклеарних клітин крові.

**Дослідження** проводили на проточному цитометрі, з використанням набору для визначення апоптозу Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I зміни мітохондріального мембранного потенціалу клітин оцінювали, використовуючи методику з флуорохромами родамін 123 і пропідій йодід. Виходячи з отриманих даних слід вважати, що психо-емоційне стресорне навантаження впливає на рівні організму та викликає активацію захисних систем організму, а іммобілізаційне навантаження, впливає на клітинному рівні і активує системи відновлення на субклітинному рівні. Сумарна дія цих систем призводить до більш ефективного захисту, хоча і з більшими негативними наслідками для організму в цілому.

**Ключові слова:** мононуклеари, стрес; апоптоз; некроз; патологія.

### **ВСТУП**

На сучасному етапі розвитку медико-біологічної науки накопичений великий обсяг знань про механізми пошкодження і адаптації клітинних систем при патологічних процесах різного генезу. Відомо, що розвиток різних хвороб (злоякісних новоутворень, серцево-судинних патологій, цукрового діабету, та інш.) пов'язано з порушенням механізмів регуляції апоптозу [1, 2].

Часто розвиток зазначених захворювань пов'язаний з хронічним стресом, впливу якого піддається людина, а широка розповсюдженість даної проблеми зумовлює інтенсивність досліджень дії стресу на процеси дизрегуляції організму. Враховуючи ключову роль дизрегуляції апоптозу в патогенезі розповсюджених захворювань людини, вивчення ролі апоптозу в механізмах накопичення патологічних клітин дозволить створити нові патогенетично-обумовлені терапії соціально значимих захворювань.

Сучасні дослідження вказують на диференційний вплив стресу різної етіології та тривалості на функціонування організму. Доведено, що тоді як гострий стрес може підвищувати деякі імунологічні параметри, то хронічний стрес негативно впливає на всі імунологічні параметри. Шляхи впливу різних видів стресу на імунну систему досі не вивчені досконально, хоча відомо, що імунні функції опосередковані гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковою та вегетативною нервовою системами [3]. Тому, перед фундаментальною наукою постає задача проведення комплексного дослідження механізмів порушення програмованої загибелі клітин в конкретних умовах та стадіях стресу, та запровадження технологій, що допоможуть корегувати даний процес.

**Мета роботи.** Вивчити вплив стресу різного генезу та тривалості на показники клітинної загибелі мононуклеарних клітин крові.

## **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Дослідження проводили на білих безпородних самцях щурів ( $n=60$ ), вагою  $200\pm 30$  г. Всі процедури виконували відповідно міжнародним правилам гуманного поводження з тваринами.

За основу психоемоційного стресорного навантаження була обрана сенсорно контактна модель вивчення агресивності і дослідження впливу психоемоційного стресорного навантаження пацюків, як фактору розвитку патологічних станів [4].

Експериментальних тварин щоденно висаджували попарно в темні бокси, кожний день змінюючи їм партнерів, які були іммобілізовані. Додатково щурів, які знаходились в пеналах, занурювали в воду  $t+50^{\circ}\text{C}$ , поступово збільшуючи час перебування, після чого їх же занурювали в воду  $t+42^{\circ}\text{C}$  з метою формування екстремального навантаження за допомогою психоемоційної напруги та гіпо-гіпертермічного виснаження (1 група). Тварини групи 2, щоденно піддавали лише психоемоційним навантаженням. Третя група тварин піддавалась лише іммобілізаційно-гіпо-гіпертермічному навантаженню. Остання група тварин (група 4), була контрольною і не піддавалась дії стресових факторів. Стресорне навантаження збільшувалось поступово протягом усього дослідження 77 діб.

Стан мононуклеарів крові оцінювали за показниками апоптозу, некрозу та зміною мітохондріального мембранного потенціалу. Для визначення рівня апоптозу анексовим методом з використанням набору для визначення апоптозу Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США) [5]. Для визначення індексу індукції апоптозу клітини інкубували з індуктором апоптозу (дексометазоном) при  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 18 годин.

Зміни мітохондріального мембранного потенціалу клітин оцінювали, використовуючи методику з флуорохромами родамін 123 («Fluka») і пропідій йодід («Sigma»). Запропонований метод дозволяє визначити в дослідному зразку життєздатні клітини, некротичні та апоптичні клітини [5].

Дослідження проводили на проточному цитометрі PAS (Partec, Германия). Статистичну обробку здійснювали з використанням програми Statistica, застосовували t-критерій Стьюдента та описували статистику.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналіз даних щодо зміни кількості клітин, які знаходились на ранній стадії апоптозу, в процесі вивчення впливу факторів стресу різної етіології, показав статистично не значимі зміни даного показника в процесі експерименту в усіх групах, що вивчалися, та на всіх строках експерименту (рис. 1а).

Оцінюючи динаміку змін зазначеного показника можна зробити висновок, що збільшення стресорного навантаження майже не впливає на збільшення кількості клітин на ранній стадії апоптозу. Рання стадія апоптозу є зворотною, тобто її можна загальмувати або зупинити взагалі, а оскільки значимих відмінностей в показниках виявлено не було то доцільно припустити, що запропоновані схеми стресорного навантаження зі збільшенням термінів, призводять до незворотних змін стану клітин. Для підтвердження даної думки слід розглянути результати дослідження кількості МНК на пізній стадії апоптозу.

Дослідження кількості МНК на пізній стадії спонтанного апоптозу виявило статистично значиме ( $p < 0,05$ ) зростання цього показника в групах, що досліджувались, після 14 діб експерименту до  $31,38 \pm 7,67\%$  проти  $23,55 \pm 4,91\%$  вихідного. Подальші дослідження виявили зниження показника, майже до контрольного значення, в першій та другій групах проте в третій спостерігалось значне статистично значиме ( $p < 0,01$ ) зростання кількості апоптичних МНК. В першій групі виявлене майже лінійне зниження кількості МНК на пізній стадії з  $31,38 \pm 7,67\%$  на 14 добу до  $14,90 \pm 4,75\%$  на 63 добу експерименту, що було статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) і найнижчим результатом, отриманим під час вивчення пізньої стадії апоптозу. Одночасно на 63 добу одержали найбільший статистично достовірний показник апоптозу МНК на пізній стадії,  $49,04 \pm 4,82\%$  в другій групі, щодо результатів третьої групи то виявлено, що стресорне навантаження запропоноване для третьої групи викликало підвищення кількості МНК на пізній стадії апоптозу, протягом всього експерименту (рис. 1б).

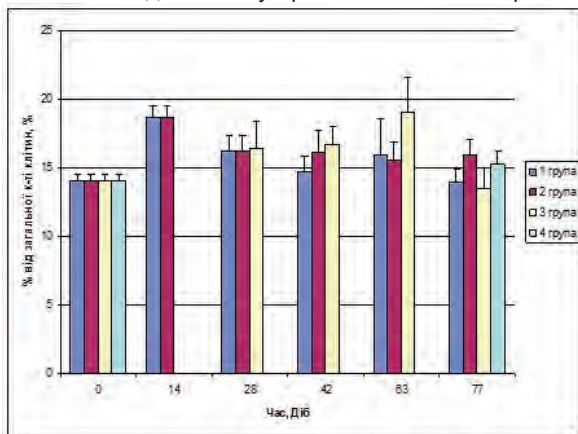


Рис. 1а

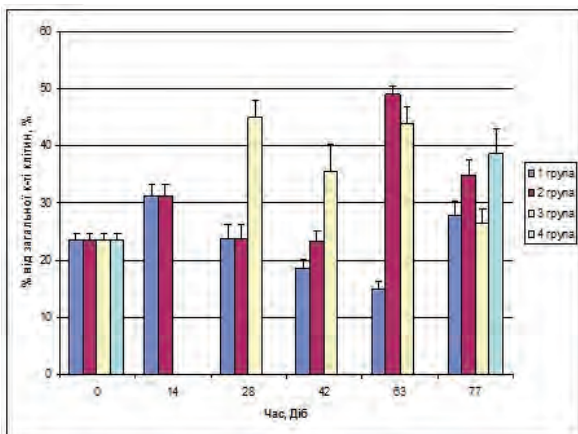


Рис. 16

**Зміни рівня МНК на ранній (а) та пізній (б) стадіях апоптозу експериментальних тварин за результатами дослідження мембранних маркерів в динаміці розвитку відповіді на різні типи стресорного навантаження.**

Вивчення рівня сумарного апоптозу мононуклеарних клітин крові при дії різних типів стресу виявило не лінійний характер змін в кожній групі. Так, в першій та другій групах спостерігалось статистично значиме ( $p < 0,05$ ) зростання показника, що вивчали, до  $50,08 \pm 8,10\%$  на 14 добу експериментального стресування проти контрольного значення  $37,63 \pm 6,13\%$ . Третя група піддавалась іммобілізаційному стресорному навантаженню з затримкою, отже спостерігалось значне підвищення рівня спонтанного апоптозу МНК до  $61,31 \pm 4,66\%$  з подальшим зниженням на 42 добу експерименту. На 63 добу спостерігалось зменшення рівня спонтанного апоптозу в першій групі до  $30,88 \pm 11,60\%$ , а в другій та третій групах виявили зростання рівня апоптозу до  $64,59 \pm 4,27\%$  та  $62,78 \pm 2,62\%$  відповідно, що було статистично достовірно ( $p < 0,05$ ), і більше ніж у першій групі.

На останніх строках експерименту 77 доба статистично достовірних відмінностей між першою та третьою групами не виявлено ( $41,65 \pm 9,74\%$  та  $39,82 \pm 8,20\%$  відповідно), проте дещо вищими були показники для другої групи і групи контролю (4 група) і становили  $50,78 \pm 11,32\%$  та  $53,83 \pm 10,34\%$  відповідно, вказані показники отримано статистично достовірно вищими за аналогічні в інших групах (рис. 2а.).

Вивчення індексу індукції апоптозу як індикатора функціонального резерву клітин організму виявило лінійне зниження цього показника в першій групі з  $0,910 \pm 0,135$  у.о. до  $0,671 \pm 0,163$  у.о. на 77 добу, що вказувало на накопичення незворотніх змін та виснаження відновних систем організму. В другій групі показано поступове накопичення патологічних факторів та активацію відновних систем на 63 добу експериментального психоемоційного наванта-

ження з подальшим виснаженням та зниженням функціонального резерву клітин. В третій групі спостерігались найбільш помітні зміни індексу індукції апоптозу з максимальною величиною після 28 діб ( $1,135 \pm 0,416$  у.о.) і лінійним зниженням до  $0,553 \pm 0,090$  у.о. після 77 діб (рис. 2б).

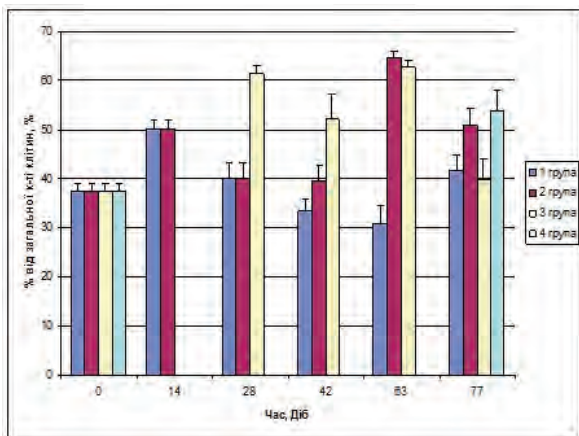


Рис. 2а

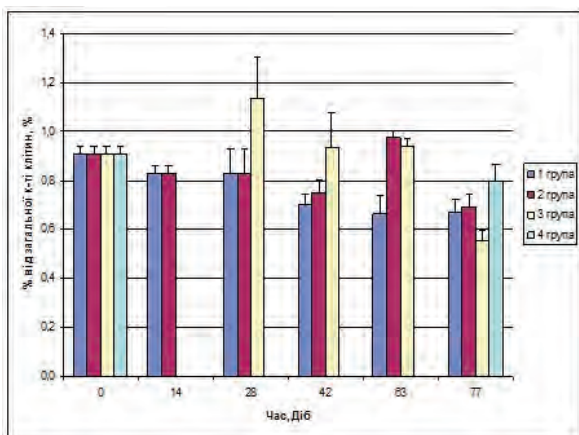


Рис. 2б

**Зміни рівня сумарного спонтанного апоптозу (а) та індекса індукції апоптозу (б) МНК експериментальних тварин в динаміці розвитку відповіді на різні типи стресорного навантаження.**

Результати отримані під час проведення досліджень впливу типу та тривалості стресорного навантаження на апоптоз МНК підтвердив попередні

припущення, щодо збільшення саме деструктивного впливу тривалого стресорного навантаження будь якого типу на МНК та виснаження відновних систем клітин організму і як наслідок зниження функціонального резерву. Було показано незначне зростання кількості клітин на ранній стадії апоптозу, проте основні відмінності спостерігались для показників кількості клітин на пізній стадії апоптозу, яка є незворотною. Підсумовуючи вивчення апоптозу МНК щурів під дією експериментального стресорного навантаження, що мало на меті моделювання розвитку раптової серцевої смерті, в клітинах зростає кількість незворотніх патологічних процесів та спостерігається виснаження відновних систем.

Вивчаючи показники некрозу МНК, було виявлено більш ніж дворазове перевищення ( $p < 0,05$ ) вихідних показників ( $6,07 \pm 1,06\%$ ) на 14 добу ( $14,19 \pm 2,90\%$ ) в першій та другій групах. На 28 добу експерименту в цих групах виявлено зниження рівня некрозу майже до контрольного значення, проте в третій групі спостерігалось підвищення рівня некрозу до  $18,13 \pm 3,80\%$ . Найбільші значення некрозу отримані в другій та третій групах після 63 діб експерименту ( $20,48 \pm 2,93\%$  та  $20,51 \pm 2,43\%$  відповідно), а на 77 добу значення майже відповідали вихідним (рис. 3а).

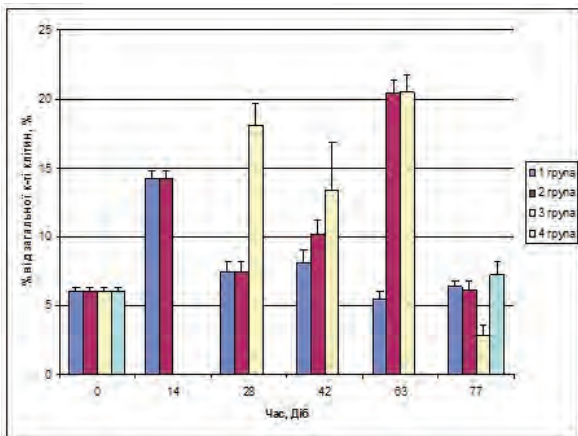


Рис. 3а

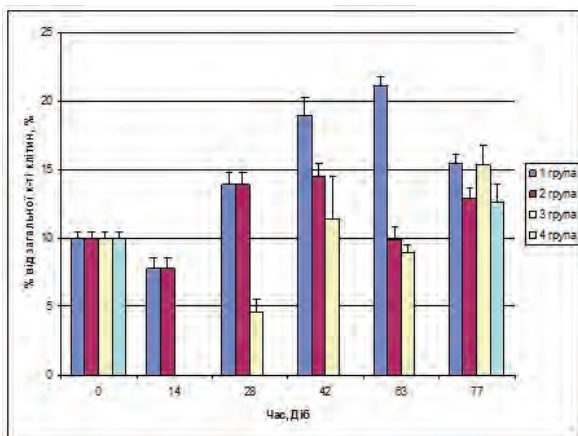


Рис. 36

**Зміни рівня некрозу (а) й апоптозу (б) МНК експериментальних тварин за результатами дослідження змін мітохондріального мембранного потенціалу в динаміці розвитку відповіді на різні типи стресорного навантаження.**

При дослідженні змін мітохондріального мембранного потенціалу МНК в динаміці розвитку відповіді на різні типи стресорного навантаження виявлено, що в першій групі на 14 добу експерименту спостерігалось статистично достовірне ( $p < 0,05$ ) зниження кількості апоптичних МНК в крові з  $10,02 \pm 1,79\%$  вихідного показника до  $7,82 \pm 3,38\%$ . Зі збільшенням строку навантаження спостерігалось лінійне статистично значиме ( $p < 0,05$ ) збільшення кількості апоптичних клітин до  $21,18 \pm 1,92\%$  на 63 добу експерименту, а 77 добу цей показник знизився до значення  $15,46 \pm 1,97\%$ . Для другої та третьої груп лінійних залежностей виявлено не було, проте в другій групі спостерігалось статистично значиме ( $p < 0,05$ ) збільшення значень кількості апоптичних клітин на 28 та 42 добу ( $13,95 \pm 2,61\%$  та  $14,53 \pm 2,82\%$  відповідно). Для третьої групи отримано майже лінійну залежність з піком на 42 добу експерименту ( $11,43 \pm 7,50\%$ ) (рис. 36).

### ВИСНОВКИ

Дослідження динаміки змін індексу індукції апоптозу виявило фізіологічну відповідь на стрес на другий тиждень, при збільшенні терміну стресування визначалось зростання показника, що вказує на виснаження відновних систем, зниження, в подальшому, значень, вказує на появу незворотніх патологічних змін в клітинах. Проте цікавим виявився той факт, що психоемоційне навантаження призводило до більш швидкого настання незворотніх змін, ніж стресорне навантаження в першій групі. Виходячи з отриманих даних слід вважати, що психоемоційне стресорне навантаження впливає на рівні організму та викликає активацію захисних систем організму, а іммобілізаційне

навантаження, впливає на клітинному рівні і активує системи відновлення на субклітинному рівні. Сумарна дія цих систем призводить до більш ефективного захисту, хоча і з більшими негативними наслідками для організму в цілому.

## Література

1. Bredesen D. E. Cell death in the nervous system n/ D.E. Bredesen, V. R. Rammohan, P. Mehlen.// Nature.- 2006. – Vol. 443, N 19. –P. 796-802.
2. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З. [и соавт.]. - М.: Слово, 2006. - 503с.
3. Hussain D. Stress immunity and health: research findings and implications / D. Hussain // International Journal of Psychosocial Rehabilitation. - 2011 - Vol. 15, № 1. - P. 94-100.
4. Kudryavtseva N.N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice / N.N. Kudryavtseva // Aggressive behavior/ - 1991. - Vol. 17. - P. 285 - 291.
5. Flow cytometry: a practical approach 3rd edition /University of Oxford; edited by Michael G. Ormerod. Oxford: Oxford Univ. Press, 2000. - 276 p.

**К. Н.Игрунова, И. С.Зозуля, Д. В.Ватлицев,  
Н. В.Русецкая, В. В.Андрियाш**

## **Изучение изменений клеточной гибели мононуклеаров обусловленной стрессом разного генеза Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л.Шупика**

Одним из наиболее важных направлений современных исследований является моделирование.

**Целью** данной работы было изучение влияния стресса разного генезиса и длительности на показатели клеточной гибели мононуклеаров.

Исследования проводили на проточном цитометре, используя набор для определения апоптоза Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I, изменения митохондриального мембранного потенциала клеток оценивали используя методику с флуорохромами родамин 123 и пропидий йодид. Анализ полученных данных дал возможность установить, что психо-эмоциональное стрессорное напряжение влияет на уровне организма и вызывает активацию защитных систем организма, а иммобилизационное напряжение, влияет на клеточном уровне и активирует системы восстановления на субклеточном уровне. Суммарное действие этих систем приводит к более эффективной защите, хотя и с более негативными последствиями для организма в целом.

**Ключевые слова:** мононуклеары, стресс, апоптоз, некроз, патология.



*K. Ihrunova, I. Zozulia, D. Vatlitsov, N. Rusetskaia, V. Andiiash*  
**Studying changes of mononuclears cell death caused by  
stress of different genesis**

**Shupyk National Medical Academy Of Postgraduate Education**

One of the most important fields of modern medical research is modeling vital functions processes.

**Aim.** To develop the difference in WBC's cell death as a result of different kind of stress load.

Flow cytometry was used to determine cell death with Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I and Rhodamine 123/PI. This article presents an experimental study of different kind of stress induced effects on mononuclear cells. According to the data psycho-emotional stress affects the levels of the organism and causes the activation of protective systems, and immobilization stress load affects the cellular level and activates the recovery system at the subcellular level. The total effect of these systems results in a more effective protection, though with greater negative effects on the body as a whole. There were used methods for determination of different stages of apoptosis that simulates the development of modern human's pathologies. It was shown that each particular type of stress activates different kind of reparation systems, which have different reserves of functioning.

**Key words:** mononuclear cells, stress, apoptosis, necrosis, pathology.

**Відомості про авторів:**

**Ігрунова Ксенія Миколаївна** – д.мед.н., зав. ЦНДЛ НМАПО імені П.Л.Шупика. Адреса: Київ, вул. Дорогожицька, 9, тел.: (044) 205-49-47.

**Зозуля Іван Савович** – д.мед.н., професор, зав. кафедри медицини невідкладних станів НМАПО імені П.Л.Шупика. Адреса: Київ, вул. Дорогожицька, 9, тел.: (044) 456-80-50.

**Ватліцов Денис Володимирович** – с.н.с. ЦНДЛ НМАПО імені П.Л.Шупика. Адреса: Київ, вул. Дорогожицька, 9.

**Русецька Наталія Василівна** – с.н.с. ЦНДЛ НМАПО імені П.Л.Шупика. Адреса: Київ, вул. Дорогожицька, 9.

**Андріяш Вікторія Вікторівна** – с. інженер ЦНДЛ НМАПО імені П.Л.Шупика. Адреса: Київ, вул. Дорогожицька, 9.