

# ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК: 612.017.2+612.014.462

© Д.В. ВАТЛИЦОВ, 2014

*Д.В. Ватлицов*

## ИСТОЩЕНИЕ ОРГАНИЗМА КАК РЕЗУЛЬТАТ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ СТРЕССОРНОЙ НАГРУЗКИ

Национальная медицинская академия последипломного образования  
имени П.Л. Шупика, Киев

**Введение.** Развитие многих современных, социально значимых заболеваний связано со стресс обусловленным нарушением механизмов регуляции клеточной гибели.

**Цель.** Изучение влияния пролонгированного стресса разной этиологии на показатели клеточной гибели мононуклеаров и биохимические показатели плазмы крови как индикаторы истощения организма.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на самцах крыс (n=60) весом 200±30 г. Изучали распределение мононуклеаров по типу клеточной гибели на проточном цитометре, также изучали липидный профиль, активность ферментов, концентрации нитритов, эндотоксинов и ПОЛ.

**Результаты.** Значимые изменения уровня суммарного апоптоза МНК при действии различных типов стресса было выявлено во 2-й (50,78±11,32%) и 4-й (53,83±10,34%) группах относительно контрольного значения 37,63±6,13%. Одновременно было показано, что в 1-й и в 3-й группах были получены меньшие, относительно контрольной группы, значения 41,66±9,74% и 39,82±8,20% соответственно.

**Выводы.** Полученные данные указывают на то, что психо-эмоциональная стрессорная нагрузка влияет на уровне организма, а иммобилизационно-гипогипертермическая нагрузка, влияет на клеточном уровне. Выявленные закономерности имеют существенное значение при определении мишени действия стрессорных нагрузок разной этиологии, а также идентификации систем регуляции данных процессов, что увеличивает потенциал коррекции.

**Ключевые слова:** апоптоз, некроз, стресс, эндотоксины, перекисное окисление липидов

### ВСТУПЛЕНИЕ

Определение основ развития разнообразных патологических состояний в организме человека является одной из ключевых задач современной физиологии. Известно, что развитие различных болезней (злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых патологий, сахарного диабета и проч.) связано с нарушением механизмов регуляции апоптоза [1].

Часто развитие указанных заболеваний связано с хроническим стрессом, воздействию которого подвергается человек, а широкая распространенность данной проблемы стимулирует исследования действия стресса на процессы дисрегуляции организма. Различными исследованиями показано, что воздействие факторов стресса приводит к нарушению гормональной регуляции клеточного гомеостаза, чрезмерному образованию свободных радикалов и эндотоксинов, которые являются одной из основных внутренних угроз нарушения баланса клеточной гибели [2, 3].

Учитывая ключевую роль дисрегуляции клеточной гибели в патогенезе распространенных заболеваний человека, изучение роли апоптоза в механизмах развития патологии позволит создать новые терапии социально значимых заболеваний.

Также в последнее время, все чаще как модель изучения механизмов регуляции системы гомеостаза, используют ответную реакцию организма на факторы стрессового характера [4, 5].

Таким образом, **целью** исследования явилось изучение влияния пролонгированного стресса разной этиологии на показатели клеточной гибели мононуклеаров и биохимические показатели плазмы крови как индикаторы истощения организма.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Исследование проводилось на белых беспородных самцах крыс ( $n=60$ ) весом  $200\pm 30$  г. Животные содержались на стандартном рационе вивария. Все процедуры проводились соответственно международным правилам гуманного обращения с животными.

За основу психо-эмоциональной стрессорной нагрузки было выбрана сенсорно контактная модель изучения агрессивности и исследования влияния психо-эмоциональной стрессорной нагрузки на крыс [6].

Экспериментальных животных ежедневно высаживали попарно в темные биксы, каждый день сменяя им партнеров, которые были иммобилизованы. Дополнительно крыс подвергали гипо- и гипертермическому воздействию с целью формирования экстремальной нагрузки (1 группа). Животные группы 2, ежедневно подвергались только психо-эмоциональным нагрузкам. Третья группа животных подвергалась только иммобилизационной и термической нагрузке. Последняя группа животных (группа 4), являлась контрольной и не подвергалась действию стрессорных факторов. Нагрузка увеличивалась постепенно на протяжении всего исследования длительностью 77 суток.

Распределение мононуклеаров по типу клеточной гибели изучали на проточном цитометре PAS (Partec, Германия) с использованием набора Annexine V Apoptosis Detection kit I (BD Bioscience, США) и Родамина 123 (Sigma-Aldrich, Германия) [7].

Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАт), аспаратаминотрансферазы (АсАт), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) и концентрации глюкозы, липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), нитритов определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Labline-100 (WestMedika, Австрия) с использованием наборов реагентов Human (Германия) и Sigma-Aldrich (Германия) [8].

Измерения уровня молекул средней массы (МСМ) и ТБК-активных продуктов (ТБК-а.п.) с использованием трихлоруксусной кислоты и тиобарбитуровой кислоты (Sigma-Aldrich, Германия) проводили на спектрофотометре СФ-46 (Россия).

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6.0, применяли t-критерий Стьюдента и описательную статистику. Доверительные интервалы средних значений определяли путем подсчета стандартной ошибки. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных по изменению количества клеток, которые находились на ранней стадии апоптоза, в процессе изучения влияния факторов стресса различной этиологии, показал статистически не значимые изменения данного показателя в процессе эксперимента во всех изучаемых группах.

Исследование количества МНК на поздней стадии апоптоза выявило статистически значимое ( $p < 0,05$ ) относительно контроля ( $23,55 \pm 4,91\%$ ) увеличение этого показателя во 2-й ( $34,82 \pm 9,07\%$ ) и 4-й ( $38,63 \pm 10,36\%$ ) группах после 77 дней экспериментальной стрессорной нагрузки (таб. 1).

Статистически значимо ( $p < 0,05$ ) большие значения уровня суммарного апоптоза мононуклеарных клеток крови при действии различных типов стресса также было выявлено во 2-й ( $50,78 \pm 11,32\%$ ) и 4-й ( $53,83 \pm 10,34\%$ ) группах относительно контрольного значения  $37,63 \pm 6,13\%$ . Одновременно было показано, что в 1-й и в 3-й группах были получены статистически значимо ( $p < 0,05$ ) меньшие, относительно контрольной группы, значения  $41,66 \pm 9,74\%$  и  $39,82 \pm 8,20\%$  соответственно.

Изучение индекса индукции апоптоза, как индикатора функционального резерва клеток организма, выявило статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение этого показателя относительно контрольного значения во всех экспериментальных группах, что указывало на накопление необратимых изменений и истощения восстановительных систем организма. В третьей группе наблюдались наиболее заметные изменения индекса индукции апоптоза до  $0,553 \pm 0,09$  у.е. против значения  $0,797 \pm 0,16$  у.е. в контрольной группе (таб.1).

Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) изменения уровня некроза наблюдались в 3-ей группе ( $2,85 \pm 1,56\%$ ) против  $6,07 \pm 1,06\%$  контрольного значения и  $7,24 \pm 2,21\%$  в контрольной группе после 77 суток.

Изучение влияния разных типов стрессорной нагрузки на показатели липидного обмена, активности ферментов и глюкозы после 77 суток выявили, что наибольшие изменения изучаемых показателей наблюдались в 1-ой группе в других группах показатели указывают на то, что психоэмоциональная нагрузка приводит к снижению концентрации ЛПНП, а концентрация ЛПВП повышается.

В то время как в 3-ей группе статистически значимые изменения отмечались только в увеличении активности АсАт.

Накопление эндотоксинов обусловлено нарушением элиминации из организма, усилением образования в тканях, или суммарным действием двух факторов молекул средней массы. Индекс распределения МСМ отражает патологические процессы накопления эндотоксинов, происходящие в организме, при которых наблюдается снижение данного показателя. Соответственно полученным результатам, расчет индекса распределения, как показателя эндогенной интоксикации, выявлено снижение ИР в 1-ой и 2-ой ( $1,093 \pm 0,154$  у.е.) группах через 77 суток относительно нулевого контроля и контрольной 4-й группы.

Таблиця 1

Изменение показателей клеточной гибели мононуклеарных клеток крови экспериментальных животных в зависимости от типа стрессорной нагрузки длительностью 77 суток (n=60, M±SD)

Показатель	Группа	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
		0 суток	77 сутки			
Уровень МНК на ранней стадии апоптоза, % от общего кол-ва клеток		14,08± 2,13	13,97± 2,97	15,96± 3,38	13,45± 3,07	15,20± 2,51
Уровень МНК на поздней стадии апоптоза, % от общего кол-ва клеток		23,55± 4,91	27,69± 8,65*	**34,82± 9,07	26,37± 5,27*	**38,63± 10,4
Уровень спонтанного апоптоза МНК, % от общего кол-ва клеток		37,63± 6,13	41,66± 9,74*	**50,78± 11,32	39,82± 8,20*	**53,83± 10,3
Уровень индуцированного апоптоза МНК, % от общего кол-ва клеток		41,89± 6,31	**62,41± 4,54*	**72,97± 3,3	**71,62± 3,58*	**67,76± 3,53
Индекс индукции апоптоза, у.е.		0,910± 0,13	**0,671± 0,16*	**0,695± 0,14*	**0,553± 0,09*	0,797± 0,16
Уровень некроза МНК, % от общего кол-ва клеток		6,07± 1,06	6,41± 1,08	6,19± 1,85	**2,85± 1,56*	7,24± 2,21

Примечание: \*\*- достоверно отличается от контрольного значения,  $p < 0,05$ ;  
\*- достоверно отличается от значений контрольной группы,  $p < 0,05$ .

Было установлено, что исходный уровень ТБК-активных продуктов, которые образуются в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода, и являются маркерами перекисного окисления липидов и оксидативного стресса, у крыс после 77 суток равен в среднем  $1,388 \pm 0,187$  ммоль/л, что было статистически значимо ( $p < 0,05$ ) меньше исходного показателя  $2,047 \pm 0,452$  ммоль/л.

Изменение биохимических показателей в плазме крови экспериментальных животных в зависимости от типа стрессорной нагрузки длительностью 77 суток (n=60, M±SD)

Показатель \ Группа	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
	0 суток	77 сутки			
ЛПВП, ммоль/л	1,42±0,40	*1,75±0,12**	*1,99±0,49	1,78±0,13	*1,89±0,03
ЛПНП, ммоль/л	0,44±0,10	0,37±0,08	0,31±0,08**	0,34±0,03	0,41±0,07
ТГ, ммоль/л	0,44±0,20	0,54±0,25**	0,59±0,23	0,53±0,10	0,87±0,32
ОХ, ммоль/л	1,22±0,28	1,13±0,23**	1,00±0,33	1,22±0,11	1,38±0,12
АлАт, Ед/л	36,40±9,87	34,27±11,14	35,40±13,32	45,70±4,63	39,09±11,07
АсАт, Ед/л	46,59±8,68	41,83±5,40**	45,58±8,68	52,87±4,81**	49,62±7,35
АсАт/АлАт	1,28	1,21	1,29	1,16	1,27
ГГТ, Ед/л	6,74±1,33	6,14±2,48	6,52±2,70	6,90±1,57	*4,93±1,72
Глюкоза, ммоль/л	3,68±0,95	4,33±1,03	*4,65±0,77	*4,71±0,41	*4,93±0,28
МСМ280, о.е.	0,173±0,041	*0,124±0,030	*0,123±0,022	0,144±0,010	*0,134±0,004
МСМ254, о.е.	0,271±0,020	0,262±0,017**	*0,253±0,026**	*0,247±0,002**	*0,227±0,003
ИР МСМ, у.е.	1,432±0,312	*1,059±0,192**	*1,093±0,154**	1,311±0,088	1,332±0,039
ТБК-а.п., моль/л	2,047±0,452	1,886±0,517**	2,003±0,455**	*0,764±0,618**	*1,388±0,187
Уровень нитритов, мкмоль/л	1,47±1,10	*1,86±1,10	1,26±0,35**	*1,02±0,10**	1,62±0,31

Примечание: \*\* - достоверно отличается от контрольного значения,  $p < 0,05$ ; \* - достоверно отличается от значений контрольной группы,  $p < 0,05$ .

Полученные при исследовании количества ТБК-активных продуктов в образцах крови экспериментальных животных, как ответа на стрессорные нагрузки различного типа, демонстрировали активацию систем антиоксидантной защиты в 3-ей группе, что отражалось в снижении количества ТБК-активных продуктов почти в два раза относительно контрольного значения. В то время как, в других группах наблюдалось увеличение количества ТБК-активных продуктов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование клеточной гибели МНК выявило снижение значений, что указывало на появление необратимых патологических изменений в клетках. Наиболее значимые изменения наблюдались в 1 группе, которая подвергалась сочетанной стрессорной нагрузке.

Результаты биохимических исследований выявили, что активация различных восстановительных систем происходит в зависимости от типа стресса, а именно, при психо-эмоциональной стрессорной нагрузке наблюдалась активация кардиопротекторных систем, в то время как, при

иммобилизационно - термической стрессорной нагрузке наблюдается активация антиоксидантных систем, сочетанная стрессорная нагрузка приводит к активации нескольких типов восстановительных систем. Суммарное действие этих систем является более эффективным, но пролонгированное действие стрессорных нагрузок приводит к скорейшему истощению и более серьезным патологическим изменениям организма в целом.

Исходя из полученных данных, следует считать, что психо-эмоциональная стрессорная нагрузка влияет на уровне организма, а иммобилизационно - гипо- гипертермическая нагрузка, влияет на клеточном уровне.

Выявленные закономерности имеют существенное значение при определении мишени действия стрессорных нагрузок разной этиологии, а также идентификации систем регуляции данных процессов, что увеличивает потенциал коррекции.

#### **Литература**

1. Bredesen D. E. Cell death in the nervous system / D.E. Bredesen, V. R. Rammohan, P. Mehlen // Nature. - 2006.- Vol. 443, № 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. Никольская В.А. Биохимический аспект рассмотрения роли молекул средней массы в организме / В.А. Никольская, Ю.Д. Данильченко, З.Н. Метрова // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия». - 2013 - Т. 26(65), № 1. - С.139-145.
5. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker/ S. Gawel, M. Wardas, E. Niedworok, P. Wardas // Wiad Lek. -2004. - Vol. 57 (9-10). - P. 453-455.
6. Kudryavtseva N.N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice // Aggressive behavior – 1991.-Vol. 17. - P. 285 - 291.
7. Flow cytometry: a practical approach 3rd edition / University of Oxford; edited by Michael G. Ormerod. - Oxford: Oxford Univ. Press, 2000. - 276 p.
8. Наборы реагентов для биохимических исследований фирмы «HUMAN», Германия / пер. на рус. язык ЗАО «АНАЛИТИКА». - М. – 2013. - С. 101.

**Д.В. Ватліцов**

## **Виснаження організму як результат пролонгованого стресорного навантаження**

**Національна медична академія післядипломної освіти  
імені П.Л. Шупика, Київ**

**Вступ.** Розвиток багатьох сучасних, соціально значущих захворювань пов'язаний зі стресом обумовленим порушенням механізмів регуляції клітинної загибелі.

**Мета.** Вивчення впливу прологованого стресу різної етіології на показники клітинної загибелі мононуклеарів і біохімічні показники плазми крові як індикатори виснаження організму.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводилось на самцях щурів (n=60) вагою 200±30 г. Вивчали розподіл мононуклеарів за типом клітинної загибелі на

проточному цитометрі, також вивчали ліпідний профіль, активність ферментів, концентрацію нітритів, ендотоксинів і ПОЛ.

**Результати.** Значимі зміни рівня сумарного апоптозу МНК при дії різних типів стресу були виявлені в 2-й (50,78±11,32%) і 4-й (53,83±10,34%) групах відносно контрольного значення 37,63±6,13%. Одночасно було показано, що в 1-й і в 3-й групах отриманні менші, відносно контрольної групи, значення 41,66±9,74% і 39,82±8,20%.

**Висновки.** Отримані данні вказують на те, що психо-емоційна стресорна нагрузка впливає на рівні організму, а іммобілізаційно-гіпо-гіпертермічна нагрузка, впливає на клітинному рівні. Визначені закономірності мають суттєве значення при визначенні мішені дії стресорних навантажень різної етіології, а також ідентифікації систем регуляції даних процесів, що збільшує потенціал корекції.

**Ключові слова:** апоптоз, некроз, стрес, ендотоксини, перекисне окислення ліпідів.

*D. Vatlitsov*

### Exhaustion as a result of prolonged stress load

**Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education**

**Introduction.** The development of many contemporary and socially significant diseases is associated with stress caused by the violation of mechanisms that regulate cell death.

**The aim** of this study was to determine the influence of prolonged stress of different etiology on the mononuclear cell death indicators and biochemical indicators of blood plasma as exhaustion signs.

**Methods and material.** The study was performed on male rats (n=60) weighing 200±30 g. There were analyzed mononuclear cell deaths on a flow cytometer. The study also involved analysis of lipid profile, enzymes activity, nitrite concentration, endotoxins concentration and lipid peroxidation.

**Results.** The significant changes of total mononuclear cell apoptosis level after different types of stress were identified in the 2nd (50.78±11.32%) and the 4th (53.83±10.34%) groups in comparison with the reference value 37.63±6.13%. At the same time in the 1st and the 3rd groups there were obtained lower values of 41.66 ± 9.74% and 39.82 ± 8.20% respectively in comparison with the control group.

**Conclusions.** These data indicate that psycho-emotional stress load affects the organism, and immobilization-hypo-hyperthermic load affects the cells. The revealed patterns are essential in determining the target of the stress loads of different etiologies, as well as identifying systems regulation of these processes, which increases the correction potential.

**Key words:** apoptosis, necrosis, stress, endotoxin, lipid peroxidation.

**Відомості про автора:**

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