

УДК 616.127

© Коллектив авторов, 2012.

## ВПЛИВ ЕНДОТОКСИКОЗУ НА МЕХАНІЗМИ АДАПТАЦІЇ ДО СТРЕСУ

**К.М. Ігрунова, Д.В. Ватліцов, В.Д. Павлюк, М.Г. Аніщук**

*Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика;  
Центральна науково-дослідна лабораторія, м. Київ.*

**AN INFLUENCE OF ENDOTOXICOSIS ON MECHANISMS OF ADAPTION TO STRESS**  
**K.N. Igrunova, D. V. Vatlitsov, V. D. Pavlyuk, M.G. Anischyuk**

### SUMMARY

Endogenic intoxication is the most common clinical pathological conditions. Biochemical, morphological, morphometric and immunological methods were used. 144 rats were observed. Stress induced endotoxycosis development was shown, which leded red-ox system, morphological structure and functional reserve of organism to disbalance. New method for revelation of endotoxycosis and selection of individual scheme of correction of disorders was proposed.

### ВЛИЯНИЕ ЭНДОТОКСИКОЗА НА МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К СТРЕСУ

**К.Н. Игрунова, Д.В. Ватлицов, В.Д. Павлюк, М.Г. Анищук**

### РЕЗЮМЕ

Проводились биохимические, морфологические, морфометрические и иммунологические исследования на 144 крысах. Показано, что в результате стресса развивался эндотоксикоз, который приводил к дисбалансу окислительно-восстановительного статуса и возникновению патологии различной сложности на гистологическом уровне. Исследование индекса индукции апоптоза свидетельствует об активации адаптивных систем организма. Также было показано, что хронический стресс приводит к адаптации организма к стрессу. Предложена методика, которая дает возможность выявить эндотоксикоз даже без внешних проявлений и определить степень его тяжести. Вышеуказанное дает возможность разрабатывать индивидуальные схемы коррекции.

**Ключові слова:** стрес, ендотоксикоз, апоптоз, функціональний резерв клітин.

Ендогенна інтоксикація (ЕІ) належить до найбільш поширених в клінічній практиці і спостерігається при різноманітних етіологічно і патогенетично нетотожних станах [4, 6].

Ендотоксини, проникаючи в клітини через пошкодження біологічних мембран, викликають порушення внутрішньоклітинного обміну, цитоліз, що веде до появи аутоантігенів, порушення розподілу і дисемінації цитолокалізованих речовин і появи патологічних метаболітів і їх гіперконцентрації [8].

При цьому патологічні процеси мають відображення у морфологічній будові внутрішніх органів та зміні їх відносних морфологічних параметрів (дистрофія, апоптоз та некроз та некробіоз).

Якщо захисні системи організму в змозі знешкоджувати ендогенні токсини, клінічної симптоматики може і не виникнути, хоча при будь-якому патологічному стані може існувати прихований або транзиторний ендотоксикоз.

Окислювальний стрес є одним із універсальних індукторів апоптозу і пов'язаний з реактогенними метаболітами кисню, які накопичуються в клітинах при різноманітних впливах, особливо на фоні пригнічення активності антиоксидантних систем [5]. Показано, що різні захворювання супроводжуються дисбалансом метаболізму, з одного боку, і порушен-

ням програми апоптозу, – з іншого [2]. Внаслідок дисбалансу про- і антиапоптогенних чинників спостерігається порушення реалізації програми апоптозу, що призводить до патологічних змін органів і тканин [7].

Метою даного дослідження було вивчення зміни рівня деяких біохімічних, імунологічних показників крові щурів та змін у морфологічній будові органів «Триади Сельє», які виникли під впливом ендотоксикозу, спричиненого різними типами стресу.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Стрес відтворювали на білих безпородних самцях щурів (n=144) вагою 200-250 гр. Тварини утримувались на стандартному раціоні віварію. Всі процедури проводились відповідно з міжнародними правилами гуманного ставлення до тварин.

Розподіл тварин по групах:

I-а група	Контроль
II-а група	14-денний хронічний стрес
III-а група	14-денний хронічний стрес + гострий
IV-а група	28-денний хронічний стрес
V-а група	28-денний хронічний стрес + гострий
VI-а група	Гострий стрес

Виводили тварин з досліду шляхом декапітації, після чого проводили відбір крові на біохімічні та іму-

нологічні дослідження. Після цього проводилася аутопсія з послідуочим макроскопічним вивченням органокмлексу, забором матеріалу на мікроскопічне дослідження: шматочки органів фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 24 годин, зрізи тканин фарбували за стандартними методиками гематоксилін-еозином. Результати заносили в створену базу даних (файл М. Excel 2003)[1, 9].

Наявність ендотоксикозу була встановлена за класичними біохімічними показниками рівня молекул середньої маси (МСМ) та кількості малонового діальдегіду (МДА), а також рівнем біохімічних метаболітів у крові. Рівень МСМ визначали скринінговим методом, з урахуванням індексу розподілу (ІР), а розрахунок кількості МДА за відповідною методикою [10].

Для визначення рівня апоптозу за анексиновим методом та вивченню мембранного потенціалу мітохондрій виділяли мононуклеарні клітини крові (МНК) експериментальних тварин на градієнті щільності фікол-урографін ( $d=1,077$ ). Для визначення індексу індукції апоптозу відбирали по  $10^5$  мононуклеарних клітин. У одну із пробірок додавали індуктор апоптозу та інкубували на поживному середовищі при  $37^\circ\text{C}$  протягом 18 годин.

Дослідження рівня апоптозу анексиновим методом проводили на проточному цитометрі PAS (Partec, Німеччина), з використанням набору для визначення апоптозу Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США); визначення мембранного потенціалу мітохондрій (ММП) проводили за загальноприйнятою методикою [12] з родаміном 123 («Fluka»).

Дослідження рівня індексу індукції апоптозу (ІА) мононуклеарних клітин (МНК) відбувалось в два етапи: перший - це дослідження рівня спонтанного апоптозу, другий – дослідження рівня індукovanого апопто-

зу. Дослідження спонтанного апоптозу дає змогу оцінити вихідний стан організму тварин після імобілізаційного стресування. Таким чином, це дає змогу виявити внутрішні порушення, котрі не виявляються звичайними методами, а саме визначити ступінь виснаження або функціонального резерву організму [3, 11].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistica, використовували t-тест для незалежних варіацій та описову статистику.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як біохімічний показник рівня ендотоксикозу визначали рівень МСМ у сироватці крові, також визначали рівень МДА та NO, як показники рівня ПОЛ. У даній роботі використовували вказаний вище показник для підтвердження наявності ендотоксикозу експериментальних тварин при моделюванні стресу. Моделювання хронічного, гострого та гострого на тлі хронічного стресу показало, що у тварин, яких піддавали тривалому хронічному імобілізаційному стресуванню протягом 28 днів, спостерігалось значне підвищення рівня МСМ, у той час як в групі яку піддавали стресуванню протягом 14 днів - спостерігалось зниження вказаних показників. Отримані дані свідчать про активації регуляторних систем організму в групі тварин, яких стресували протягом 14 днів. Вивчення впливу гострого стресу на формування ендогенної інтоксикації показало, що гострий стрес викликає різку активацію регуляторних систем, що призводить до зниження рівня ендотоксинів у крові. Але дослідження впливу гострого стресу на тлі хронічного показало, що при короткотривалому 14-денному хронічному стресі відбувалось виснаження організму і спостерігалось різке збільшення рівня МСМ. У той же час після тривалого, 28-денного хронічного стресування, спостерігалось зниження рівня МСМ нижче контрольних показників (Рис.1).

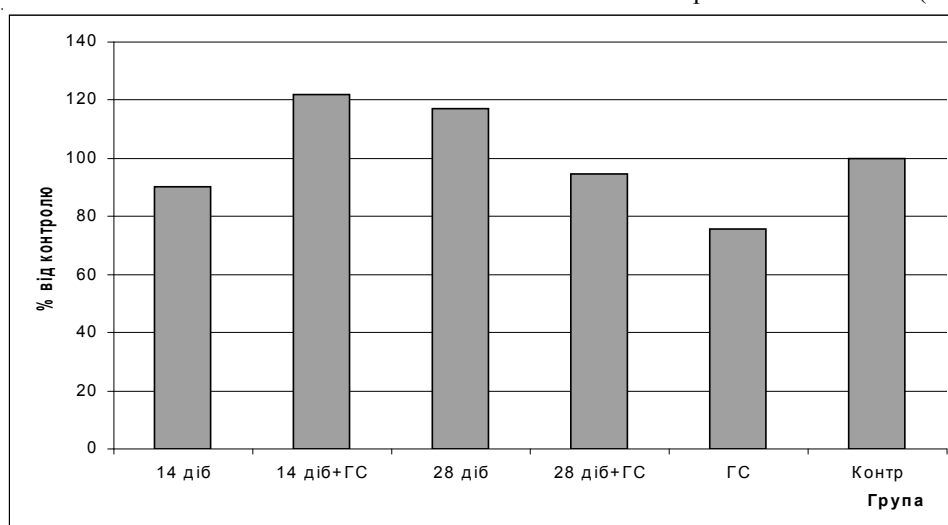


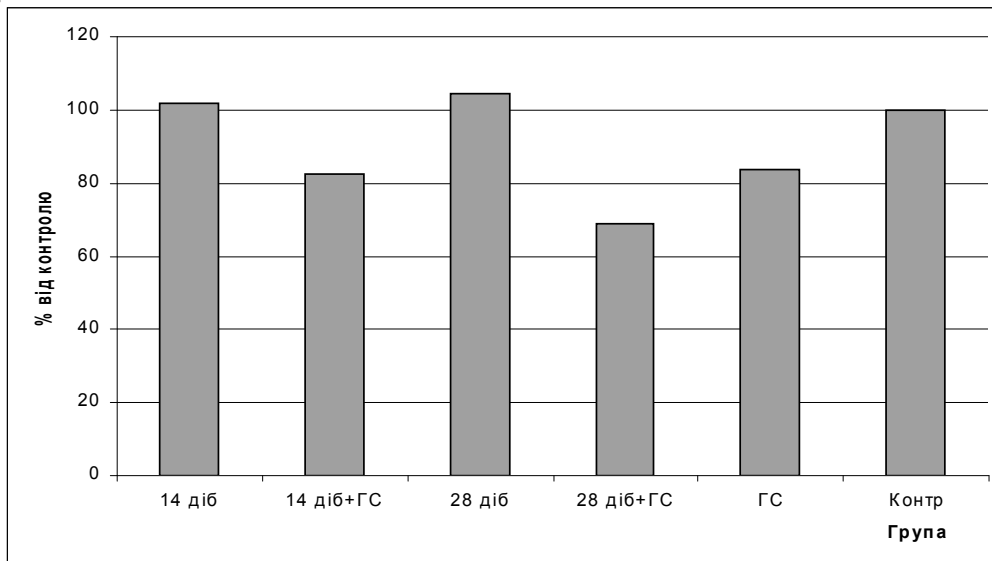
Рис. 1. Вплив імобілізаційного стресу на рівень молекул середньої маси в сироватці крові експериментальних тварин у відсотках відносно контролю.

Виходячи з того, що МСМ сприяють посиленню перекисного окислення ліпідів, доцільно було

вивчити рівень МДА та нітритів у крові експериментальних тварин. Отримані результати свідчать

про те, що ендогенна інтоксикація, яка розвинулася в результаті стресу, призводила до дисбалансу окисно-відновного статусу в групах, які піддавалися гострому стресу та гострому стресу на тлі хро-

нічного, що свідчить про зменшення субстрату для окислювання і, відповідно, про виснаження пулу окислювання в організмі експериментальних тварин (Рис. 2).

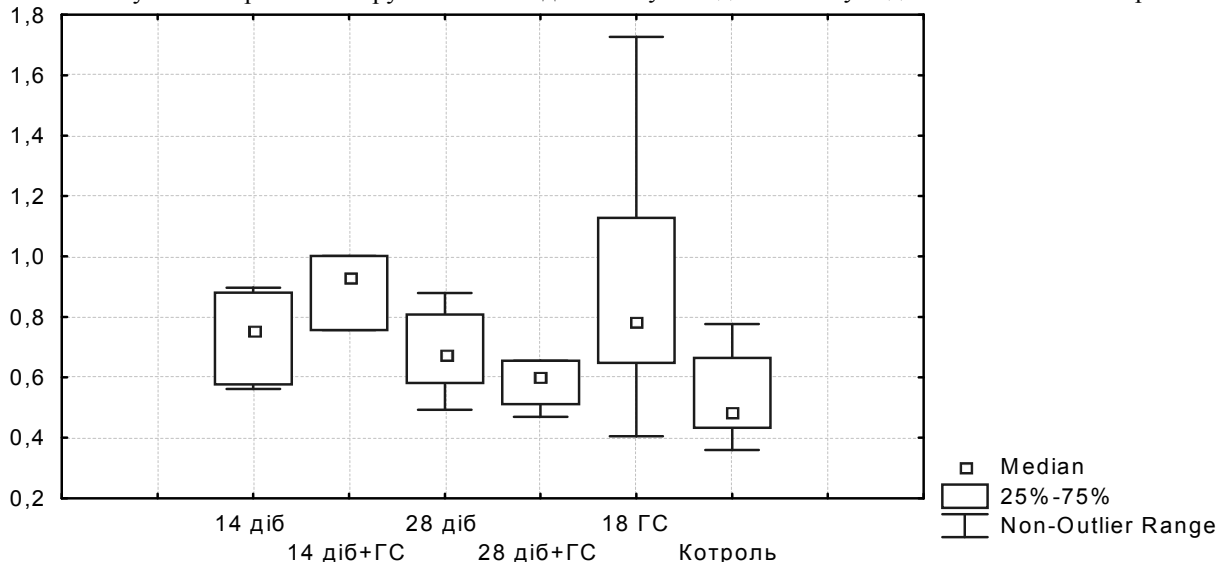


**Рис. 2.** Вплив іммобілізаційного стресу на рівень малонового діальдегіду в сироватці крові експериментальних тварин у відсотках відносно контролю.

Наступним етапом дослідження було вивчення морфологічних змін у будові органів «Триади Сельє». Реакція тимусу проявляла себе розладами кровообігу. І чим інтенсивнішим був шкідливий вплив – тим виразнішими вони були: починаючи від підвищеного кровонаповнення судин та застою, закінчуючи стазом крові чи сладж-феноменом. Дистрофічні зміни в тимусі спостерігались в групах після 28-ден-

ного стресу та 28-денного з гострим стресом.

Морфологічні дослідження селезінки виявили, що при 14-денному стресі синусоїди були дещо більші, в іншому структура органу не відрізняється від структури контрольної групи. Додавання гострого стресу тільки посилювало явища застою крові, а при 28-денному - зумовило зменшення співвідношення площі фолікулів відносно синусоїдів. В останніх спостерігався



**Рис. 3.** Вплив стресіндукованого ендотоксикозу на індекс індукції апоптозу мононуклеарних клітин крові експериментальних тварин.

застій крові, еритроцити були склеєні в «монетні стовпчики», з'явився пігмент коричневого кольору. Патологічні прояви в наднирниках, як і в селезінці, також відмічалися на рівні мікроциркуляторного русла (МЦР)

та відповідали рівню стресу. І тільки при 28-денному стресі з додаванням гострого спостерігались поодинокі крововиливи, а в клітинах коркової та мозкової зони наднирників – зерниста дистрофія. При гострому стресі

було виражене повнокров'я судин, а в окремих зонах клітин паренхіми, віддалених від судин – зерниста дистрофія. По всій стромі - інтерстиційний набряк.

Дослідження рівня індексу індукції апоптозу виявило, що іммобілізаційний стрес викликає накопичення ендотоксинів, що відображається у зниженні функціонального резерву. Так стресування протягом 14 діб призводило до збільшення рівня ПА до 0,738 ( $p < 0,05$ ), а протягом 28 діб до 0,686, тобто спостерігалось накопичення ендотоксинів та активація відновних систем організму. Дослідження впливу гострого стресу на функціональний резерв організму тварин

показало, що 18-годинний гострий стрес призводить до зростання ПА і відповідало значенню 0,913 ( $p < 0,05$ ), а на фоні хронічного 14-денного та 28-денного до 0,897 ( $p < 0,05$ ) та 0,650 відповідно (рис. 3).

Апоптоз є природним типом загибелі клітин, який не впливає на оточуючі клітини, тому доцільним було вивчення рівня некрозу МНК. Було показано, що стресіндукований ендотоксикоз зумовлює збільшення рівня некрозу в групах, які піддавались стресуванню протягом 14 діб з додаванням гострого 18-годинного та у групі 28 діб, 1,04 % та 1,29 % відповідно. В інших групах зростання рівня некрозу не спостерігалось (рис. 4).

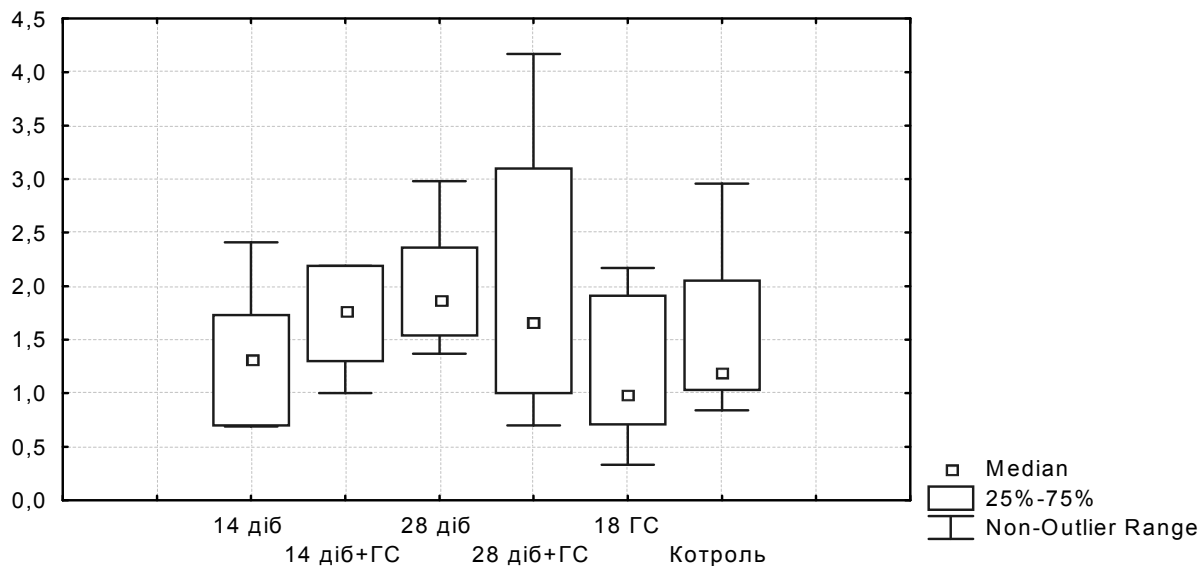


Рис. 4. Вплив стресіндукованого ендотоксикозу на рівень некрозу мононуклеарних клітин крові експериментальних тварин.

Отримані результати дослідження функціонального резерву та клітинної інактивації свідчать про наявність стресіндукованої ендогенної інтоксикації, що в свою чергу впливає на функціональний резерв організму. Дослідження індексу індукції апоптозу вказують на накопичення ендотоксинів під час стресування, що відображається у активації адаптивних систем організму та у зростанні індексу індукції апоптозу. Менш виражена реакція на гострий стрес після стресування протягом 14 діб та зниженням індексу індукції апоптозу після стресування протягом 28 діб хронічний стрес вказує на наявність адаптації.

#### ВИСНОВКИ

Отримані дані в результаті експериментального дослідження впливу іммобілізаційного стресу свідчать про те, що в результаті розвивається ендотоксикоз, свідченням чого є нагромадження ендотоксинів в організмі тварин.

Базуючись на проведених дослідженнях, можна вважати, що всі типи стресу призводять до виникнення патологічних змін, і вони є різними. У всіх випадках було виявлено, що ендотоксикоз призводить до виникнення патології різної складності на гістологічному рівні. Зауважимо, що один і той же тип стресу

часто викликає різні за проявами патологічні зміни у щурів однієї групи, що свідчить про індивідуальний рівень чутливості організму щурів у кожному конкретному випадку.

Так дослідження індексу індукції апоптозу свідчать про активацію адаптивних систем організму, хронічний стрес призводить до адаптації, що відображається у менш вираженій реакції на гострий стрес після стресування протягом 14 діб та зниженням індексу індукції апоптозу після стресування протягом 28 діб.

Запропоновано методику, що дає змогу виявити ендотоксикоз навіть без зовнішніх проявів та визначити ступінь його важкості, що, виходячи з природи стресу, є дуже важливим у сучасній медичній практиці, оскільки стрес є одним з найбільш значущих чинників розвитку патологій різного генезу. Вищенаведене дає змогу розробляти індивідуальні схеми корекції.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Волкова О. В., Елецкий Ю. К. Основы гистологии с гистологической техникой. — М., 1982., 342 стр.
2. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. - М.: МАИК Наука/ Интерпериодика, 2001. – 343 с

3. Ігрунова К.М. Апоптоз моноклеарних клітин крові у хворих з патологією серцево-судинної систем / Ігрунова К.М., Моторна М.М., Степанова Т.І. // Лабораторна діагностика. – 2004. - № 1. – с.16-18.
4. Корякина Е.В., Белова С.В. Особенности патогенетических механизмов эндогенной интоксикации у больных ревматоидным артритом/ Научно-практическая ревматология. - №1, 2001.
5. Кравчун П.Г., Бабаджан В.Д., Ибрагим Муса Маник и др. Влияние оксидативного стресса на функцию эндотелия и апоптоз при гипертонической болезни, возможности терапии АГ1-блокатором кандесартаном/ Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина, 2005г.
6. Любарский М. С., Овсянникова Т. В., Пекарев О. Г. И др. Синдром эндогенной интоксикации хронических воспалительных заболеваний органов малого таза и возможность его коррекции с использованием сорбционно-лимфогенных технологий/ Бюллетень СО РАМН. - №1, 2004. - С. 27-32.
7. Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Часовских Н. Ю. и др. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе// Цитология. – Т.51, №4. - 2009. – С. 329-334.
8. Савченкова Л.В., Болгов Д.М., Коробков О.А. Обоснование путей фармакокоррекции шахтной травмы / Проблемы военного здравоохранения. – К.: Янтар, 2002. - С. 441-443.
9. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника. - 1996, 548 стр.
10. Тупикова З.А. Влияние молекул средней массы, выделенных из крови обожженных пациентов на состояние перекисного окисления липидов в тканях животных. //Вопр. мед. химии.- 1990.- №36. –С.24-26.
11. Apoptosis: Applied Reagents and Technologies // Instruction Manual. – BD Bioscience. – 1998. - 2nd ed. – 99 p.
12. Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X. et al Cytometry 27, 1, 1997;