

УДК 612.1:616-018:616

© К.М. Ігрунова, Д.В. Ватліцов, В.В. Андріяш, 2012.

ВПЛИВ СТРЕСУ НА АПОПТОЗ ТА НЕКРОЗ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН ОРГАНІЗМУ

К.М. Ігрунова, Д.В. Ватліцов, В.В. Андріяш*Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика, центральна науково-дослідна лабораторія (керівник – д.м.н. К.М. Ігрунова), м. Київ.*

CELLS' INACTIVATION AFTER LONG TERM STRESS INDUCTION

K.M. Igrunova, D.V. Vatlitsov, V.V. Andriyash

SUMMARY

Stress is evolutionally obtaining reaction on foreign irritant and provides adaptation. The most prevalent stress of the present is psychoemotional duty and it is very hard for diagnostic. The most adequate method for diagnostic of psychoemotional duty is investigation of degree of emaciation of cells. In this study were investigated the level of apoptosis, degradation of aerobic production of energy and functional reserve of organism. Investigations of index of induction of apoptosis were shown increasing of level of this index and mean an activation of recover system. Also were shown that chronic stress lead to adaptation. Proposed method enables to discover stress duty and provide an individual correction of it.

ИНАКТИВАЦИЯ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА ОБУСЛОВЛЕННАЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ СТРЕССОВОЙ НАГРУЗКОЙ

К.М. Ігрунова, Д.В. Ватліцов, В.В. Андріяш

РЕЗЮМЕ

Эволюционно сложилось, что стресс является естественной реакцией на внешний раздражитель, который в свою очередь дает возможность адаптироваться. Тем не менее, наиболее распространенным стрессом современности является психоэмоциональный стресс, поэтому диагностировать такие состояния очень тяжело. Наиболее адекватным способом оценки стрессовой нагрузки есть определения степени истощения организма на клеточном уровне. В работе определяли уровень апоптоза, нарушение аэробной энергопродукции в митохондриях и оценивали функциональный резерв организма. Исследование индекса индукции апоптоза свидетельствуют об активации восстановительных систем, обусловленных накоплением эндотоксинов, и выражается увеличением индекса индукции апоптоза. Тем не менее, хронический стресс приводит к адаптации. Предложенная методика дает возможность выявить стрессовую нагрузку даже без внешних проявлений и определить степень тяжести и разработать индивидуальные схемы коррекции.

Ключові слова: стрес, функціональний резерв, апоптоз, некроз, мононуклеарні клітини крові.

Стрес – є чи не найголовнішою проблемою сучасності. Нервова система людей, які живуть у постійній фізичній та емоційній напрузі, не завжди успішно протистоїть навантаженням, нерідко організм не справляється з цим, і на його фоні розвиваються різноманітні патології [1].

Проте Г. Сельє у своїй роботі [2] описував фізіологічний стрес як загальний адаптаційний синдром та характеризував його часовим послабленням чи порушенням функцій організму. Так при формуванні стійкої адаптації порушення гомеостазу, що складає основу стресового навантаження, поступово зникають як і саме стресове навантаження, зігравши свою роль у формуванні адаптації. Цей стан між стресом та адаптацією є доказом того, що в процесі еволюції, стрес сформувався як необхідна неспецифічна ланка складного механізму адаптації [3].

Оскільки стрес є головною передумовою адаптації, а в сучасному житті людина дуже часто піддається стресовим навантаженням, в основному психоемоційним, постає питання ціни адаптації та шляхів виявлення стресу. Так найчутливішою до зовнішніх подразників є імунна система, а

навантаження на імунну систему легко виявити та оцінити вивчаючи апоптоз мононуклеарних клітин крові (МНК) [4].

Апоптоз відіграє важливу роль у підтримці гомеостазу. На відміну від некрозу, коли порушується цілісність клітини та вивільняється її вміст (потенційно небезпечний) в міжклітинний простір, апоптоз призводить до утворення апоптичних тілець, які елімінуються без шкоди для оточення шляхом фагоцитозу. Настає апоптоз в результаті пошкодження, старіння або виснаження клітин [5-8].

Виходячи з вищенаведеного доцільним було дослідити вплив стресу на рівень апоптозу, порушення аеробної енергопродукції в митохондриях та оцінити функціональний резерв організму.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Стрес відтворювали на білих безпородних самцях шурів (n=60) вагою 200-250 г. Всі процедури виконувалися відповідно до міжнародних правил гуманного ставлення до тварин. Стресування шурів відбувалося протягом 14 і 28 діб по 60 хвилин на добу, та у ці ж строки з додаванням 18-годинного гострого стресу та 18-годинного гострого стресу.

Дослідження рівня апоптозу анексиновим методом провадили на проточному цитометрі PAS (Partec, Німеччина) з використанням набору для визначення апоптозу Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США), некроз вивчали шляхом визначення мембранного потенціалу мітохондрій (ММП) провадили за загальноприйнятою методикою [9] 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 індукованого апоптозу. Дослідження апоптозу дає змогу оцінити вихідний стан організму тварин після іммобілізаційного стресування. Таким чином, це дає змогу виявити внутрішні порушення, котрі не виявляються звичайними методами, а саме визначити ступінь виснаження або функціонального резерву організму [10].

Статистичну обробку результатів провадили з використанням програми Statistica, використовували t-тест для незалежних варіацій та описову статистику.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження впливу стресу на рівень спонтанного апоптозу показало, що 1-годинна іммобілізація тварин протягом 14 та 28 діб призводить до збільшення рівня апоптозу МНК відносно контролю, проте стресування протягом 28 діб призводить до адаптації, що відображається у менших значеннях апоптозу МНК відносно значень отриманих після стресування протягом 14 діб, а саме 42,26 % ($p < 0,01$) та 33,55 % відповідно. Дослідження рівня апоптозу МНК після стресування протягом 14 та 28 діб з додаванням гострого 18-годинного стресування та 18-годинного стресування показало, що гостре стресування призводить до більш негативних наслідків ніж пролонговане хронічне. Так, було виявлено, що показники рівня апоптозу МНК тварин, що зазнали тільки гострого 18-годинного стресування перевищували контрольні майже в два рази, що становило 46,97 % ($p < 0,001$). Додавання гострого стресу на фоні хронічного призводило до зниження рівня апоптозу МНК до 42,55 % ($p < 0,01$) після стресування протягом 14 діб та до 28,01 % після стресування протягом 28 діб (рис. 1).

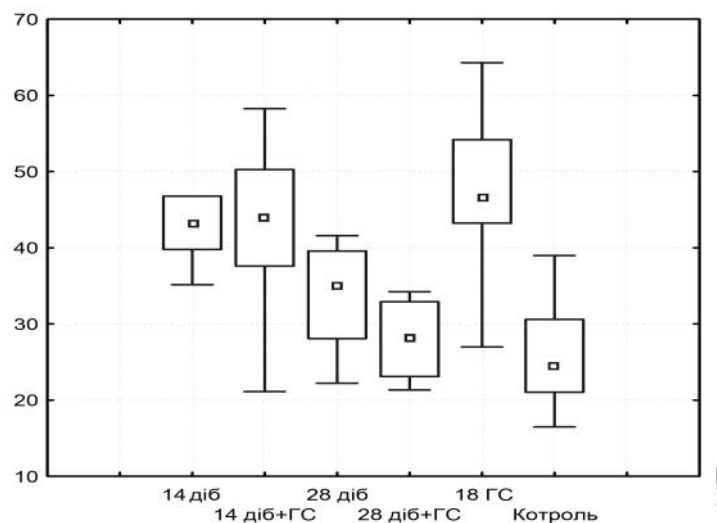


Рис. 1. Вплив стресу на рівень спонтанного апоптозу мононуклеарних клітин крові експериментальних тварин.

Наступним етапом досліджень впливу стресу, було вивчення рівня індукованого апоптозу МНК. Виявлено, що найбільшого впливу на рівень індукованого апоптозу зазнали тварини, котрих піддавали пролонгованому одноденному іммобілізаційному стресу протягом 14 діб, рівень апоптозу складав 63,91 % та гострому 18-годинному стресуванню (56,60 %). Показники в інших групах не перевищували контрольних значень.

Дослідження рівня індексу індукції апоптозу виявило, що іммобілізаційний стрес викликає порушення ендogenous генезу, що відображається у зниженні функціонального резерву. Так

стресування протягом 14 діб призводило до збільшення рівня індексу індукції апоптозу (ІА) до 0,738 ($p < 0,05$), а протягом 28 діб до 0,686, тобто спостерігалась зниження активності відновних систем організму. Дослідження впливу гострого стресу на функціональний резерв організму тварин показало, що 18-годинний гострий стрес призводить до зростання ІА 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. 2).

Було показано, що стрес зумовлює збільшення рівня некрозу в групах, що піддавались стресу протягом 14 діб з додаванням гострого 18-годинного

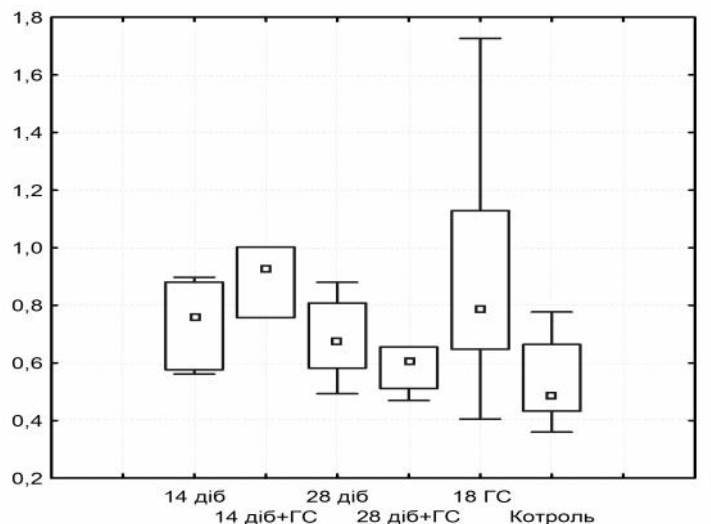


Рис. 2. Вплив стресу на індекс індукції апоптозу мононуклеарних клітин крові експериментальних тварин.

та у групі 28 діб стресу, 1,04 % та 1,29 % відповідно. В інших групах рівень некрозу не перевищував контрольні показники.

Отримані результати свідчать про негативний вплив стресу на функціональний резерв організму. Так дослідження ПА свідчать про вплив на відновні системи під час стресування, що в залежності від часу стресування відображається у зміні індексу індукції апоптозу. Проте помірний 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.

Показано зростання рівня некрозу в групах, що зазнали 14-денного з додаванням 18-годинного стресу та 28 денного, що свідчить про виснаження відновних систем.

Запропонована методика дає змогу виявити стрес 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 розробити індивідуальні схеми корекції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Chiang-shan Ray Li Inhibitory control and emotional stress regulation: neuroimaging evidence for frontal-limbic dysfunction in psycho-stimulant addiction / Chiang-shan Ray Li, Rajita Sinha // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 2008. - V.32, N 3. - p. 581-597.
2. Селье Г. На уровне целого организма. — М: Наука, 1972. — 122 с.
3. Никонов В. В. Стресс: Современный патофизиологический подход к лечению. — Харьков: Консум, 2002. — 240 с.

4. Rus H. The role of the complement system in innate immunity / Rus H., Cudrici C., Niculescu F. // *Immunol. Res.* - 2005. - V. 33, N 2. - P. 103-12.

5. Караулов А.В. Исследование применений апоптоза лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови у пациентов с хроническим обструктивным бронхитом на фоне комплексной терапии с включением полиоксидония / А.В. Караулов, Н.Е. Самойлов, Д.В. Кокушков // *Иммунология.* - 2007. - Т. 28, №2. - С. 93-95.

6. Непомнящих Л.М. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Д.Е. Семенов // Москва, РАМН. - 2003. - 250с.

7. Мамонтова Т.В. Стійкість до апоптозу, індукованого зв'язуванням молекул МНС II класу в мононуклеарних клітинах периферичної крові хворих на atopічну бронхіальну астму: роль апоптоз-регуляторних білків / Т.В. Мамонтова, І.П. Кайдашев // *Імунологія та алергологія.* - 2007. - № 3. - С. 27-31.

8. Влияние оксидативного стресса на функцию эндотелия и апоптоз при гипертонической болезни, возможности терапии АТ1- блокатором кандесартаном / П.Г. Кравчун, В.Д. Бабаджан, Ибрагим Муса Маник, Т.В. Горбач // Харьковський національний медичинський університет, Україна Городская клиническая больница № 27, г. Харьков, Україна, 2005.

9. Apoptosis: Applied Reagents and Technologies // *Instruction Manual.* - BD Bioscience. - 1998. - 2nd ed. - 99 p.

10. Ігрунова К.М. Апоптоз мононуклеарних 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.