

УДК: [612.353 + 612.013] : 616.8-009

## ВПЛИВ ГОСТРОГО СТРЕСУ НА ПРОЦЕСИ АПОПТОЗУ І ВМІСТ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ У ТКАНИНІ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

М.М. Рябушко, Р.В. Луценко, Ю.О. Карусишук  
ВДНЗ України „Українська медична стоматологічна академія” М.Полтава

Вплив стресорних чинників на організм супроводжується функціональними, біохімічними і структурними розладами в ЦНС та периферичних органах [10]. Одним із органів, який активно реагує на вплив надзвичайних факторів, є печінка [1]. За умов стресу в печінці активуються процеси глікогенолізу і гліколізу, порушується прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, дезінтокикаційна і білірубінотворююча функції, підвищується проникність мембран гепатоцитів [5, 6]. Такі метаболічні зміни в органі можуть призвести до ушкодження клітин печінки та їх загибелі [4]. Загибель клітин у тканинах зрілого організму може відбуватись як шляхом некрозу, так і шляхом апоптозу [9]. Апоптоз – це генетично запрограмована клітинна смерть у відповідь на вплив деяких внутрішньоклітинних та зовнішніх факторів [9]. Одним із яких може бути і стрес. Однак вплив гострого стресу на процеси апоптозу в гепатоцитах досліджений недостатньо.

**Метою** роботи було вивчення змін вмісту нуклеїнових кислот і процесів апоптозу в тканині печінки за умов гострого стресу.

**Матеріал та методи дослідження.** Експеримент виконано на 16 щурах-самцях лінії Вістар масою 200-250 г. Тварин утримували в умовах “відкритої системи”, природного освітлення, при температурі 18 - 21<sup>0</sup>С і відносній вологості повітря 45-60%. Вони одержували раціон типу кормової суміші і охолоджену прокип’ячену воду за потребою з автоматичних поїлок. Досліди були виконані навесні в один і той же час доби. Гострий стрес моделювали шляхом іммобілізації тварин на спині за Сел’є протягом 3-х годин. Евтаназію щурів здійснювали під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) через 1,5 год після завершення дії стресорного фактору шляхом забору крові з серця до його зупинки. Контролем слугували інтактні щури. В гомогенатах печінки визначали вміст РНК, ДНК і обчислювали їх співвідношення (коефіцієнт Ріглера) [10]. Принцип методу ґрунтується на виділенні нуклеопротейнів та їх кислотному і лужному гідролізі, з подальшим спектрофотометричним визначенням концентрації РНК при довжині хвилі 260 нм і ДНК при довжині хвилі 270 – 290 нм. Наявність апоптозу в тканині печінки оцінювали за міжнуклеосомною фрагментацією ДНК. Зразки тканини заморожені при - 70<sup>0</sup> С гомогенізували на сухому льоду. Потім додавали буфер виділення (рН = 7,5) у співвідношенні 10 мл на 1 г тканини. Виділення ДНК проводили з використанням протеїнази К і фенолу. ДНК осаджували центрифугуванням, висушували під вакуумом і розчиняли в Трис-ЕДТО буфері [7]. Фрагменти ДНК розділяли з використанням 1,8% агарозного гелю. Електрофорез тривав 3 години. Забарвлення ДНК проводили з використанням броміду етидію. Отримані електрофореграми візуалізували в ультрафіолетових променях і фотографували. Про посилення апоптозу в тканині печінки свідчила наявність феномену “сходинок” - смуг, відстань між якими кратна 150 – 200 парам основ. Статистичну обробку кількісних показників здійснювали з використанням критерію t Стьюдента [3].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Експериментальними дослідженнями встановлено, що вміст РНК у гепатоцитах щурів за умов гострого іммобілізаційного стресу зменшився в 2,1 рази (рисунок). Стресорний вплив викликав зменшення рівня ДНК в тканині печінки в 2,3 рази порівняно з показниками інтактних щурів (p<0,002) (див. рисунок). За цих умов коефіцієнт Ріглера, тобто співвідношення РНК/ДНК у гепатоцитах інтактних тварин становив 1,44. При стресі цей показник вірогідно не змінювався порівняно з інтактними тваринами. Зменшення вмісту РНК в тканині печінки на фоні гострого стресу імовірно, вказувало на зниження метаболічної активності геному, а також на пригнічення процесів транскрипції в органі при дії на організм надзвичайних факторів.

Зменшення вмісту ДНК за умов гострого стресу, на нашу думку, пов’язане з пригніченням процесів репарації і репаративного синтезу двониткових нуклеїнових кислот.

Імовірно, ці зміни вмісту нуклеїнових кислот зумовлені надлишком глюкокортикоїдів при стресі та їх катаболічною дією, зокрема на геном клітин. Відсутність вірогідних змін співвідношення РНК/ДНК на фоні загального зменшення нуклеїнових кислот при гострому стресі може вказувати, що в стадію тривоги гострого стресу порушення обміну нуклеїнових кислот рівною мірою стосується і ДНК і РНК. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів стосовно катаболічної направленості впливу стресорного фактору на функціональну активність геному гепатоцитів інших лабораторних тварин [12].

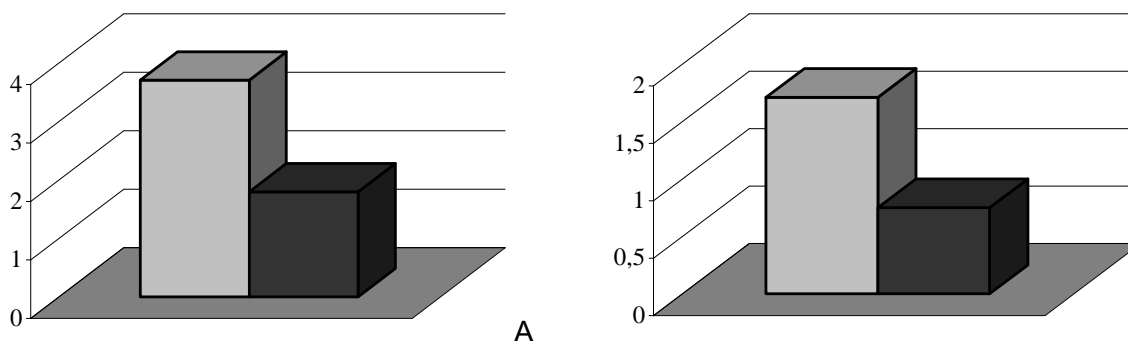


Рис. Зміни вмісту нуклеїнових кислот в тканині печінки за умов гострого стресу. А – РНК; Б – ДНК.  
Примітки: 1 – Інтактні; 2 – Гострий стрес; 3 – \* -  $p < 0,05$  порівняно з інтактними щурами (контроль).

При дослідженні процесів апоптозу показано, що на електрофореграмах інтактних щурів існує по одній яскравій смугі, яка розташована поблизу лінії старту. Це свідчить, що ДНК виділена з печінки інтактних тварин високомолекулярна і не містить розривів. У тварин підданих стресу на електрофореграмах спостерігається по кілька смуг, розташованих від середини дистанції електрофореграми до її фінішу. Порівняння таких смуг з маркером молекулярних мас фага лямбда М 13 показує, що вони кратні 150 – 200 пар основ. Такий феномен сходинок свідчить про посилення загибелі гепатоцитів за апоптотичним типом [9]. Посилена фрагментація ДНК внаслідок активації апоптозу при гострому стресі, вочевидь, є одним з факторів, які зменшують вміст нативної ДНК визначеної біохімічними методами в тканині печінки. Таким чином, стресорні пошкодження печінки відбуваються шляхом посилення програмованої загибелі гепатоцитів, що супроводжуються зниженням вмісту ДНК і рівною мірою пригніченням транскрипції, про що свідчило зменшення вмісту РНК в органі.

Вочевидь, ініціальною ланкою виявлених процесів є посилення перекисного окиснення ліпідів і порушення антиоксидантного захисту в печінці. Такі зрушення відмічені нами в попередніх дослідженнях, а також відоме з літератури [6, 14]. Іншим імовірним механізмом ініціації апоптозу при стресі може бути підвищення концентрації  $Ca^{2+}$  в тканині печінки [7, 13], оскільки відомо, що накопичення цього йону в клітинах активує ендонукліази, призводить до утворення апоптотичних тілець, порушує структуру клітинних мембран, функцію мітохондрій та призводить до загибелі клітини [2, 12]. Біологічна доцільність виявлених феноменів, вочевидь, полягає в тому, що відбувається посилення планової елімінації функціонально неповноцінних клітин і їх метаболічні перетворення з вивільненням пластичних субстратів, які будуть використані в анаболічну фазу гострого стресу.

#### Висновок

Встановлено, що гострий стрес сприяє зменшенню вмісту нуклеїнових кислот в тканині печінки, а ушкодження печінки при гострому стресі супроводжується посиленням процесів апоптозу в органі.

#### Література

1. Кресюн В.В. Механізми стрес-індукованих уражень печінки: Автореф. дис.... к. мед. наук. 14.03.04 / Од. держ. мед. ун-т. - Одеса, 2002. - 17 с.
2. Кудрин А.В., Жаворонков А.А. Роль мікроелементів и кальція в регуляції апоптоза // Усп. совр. біології. - 1998. - Т. 118, вып.5. - С. 623 - 629.

3. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-био-логических исследованиях с использованием Excel.- К.: Морион, 2000.-320 с.
4. Логинов А.С., Матюшин Б.Л. Цитотоксическое действие активных форм кислорода и механизмы развития хронического процесса в печени при её патологии // Пат. физиол. и эксперим. терапия. - 1996. - №4. - С.3-5.
5. Луценко Р.В. Ефективність нейротропних засобів при порушеннях дезінтоксикаційної функції печінки за умов гострого стресу // Ліки. – 2005. - №1-2. – С. 34-38.
6. Луценко Р.В. Гепатозахисна дія мексидолу і її системний аналіз // Ліки.– 2007.- №1-2.– С. 71-76.
7. Мірошніченко А.О., Ляшенко В.П., Лукашов С.М. Вплив стресу різного генезу на накопичення кальцію в печінці та її функціональну активність // Фізіол. журн. - 2002. - Т. 48, №5. - С. 22 - 26.
8. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер.с англ. / Под ред. С. Херрингтона. Дж. Макги.-М.: Мир,1999. - 558 с.
9. Программирование клеточная гибель / Под ред. проф. В.С. Николаева. - СПб.: Наука, 1996. - 276 с.
10. Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // Пат. физиол. и эксперим. терапия. - 2000. - №2. - С. 24-31.
11. Трудюлюбова М.Т. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // Современные методы биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича.- М.: Медицина,1977.- С.313-316.
12. Шкурूपий В.А. Ультраструктура клеток печени при стрессе.-Новосибирск:Изд.“Наука”,Сиб. отд., 1989. - 144 с.
13. Cain K., Inayat-Hussain S. H., Wolfe J.T., Cohen G.M. DNA fragmentation in rat liver nuclei is stimulated by Mg<sup>2+</sup> alone and / Mg<sup>2+</sup> but not by Ca<sup>2+</sup> alone // FEBS Lett. 1994. - Vol. 349. - P. 385-391.
14. Gursoy E., Cardounel A., Hu Y., Kalimi M. Biological effects of long-term caloric restriction: adaptation with simultaneous administration of caloric stress plus repeated immobilization stress in rats // Exp. Biol. Med. (Maywood). - 2001. - Vol.226, №2 - P. 97-102.

#### Резюме

#### ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО СТРЕССА НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА И СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС Рябушко Н.Н., Луценко Р.В., Капустник Ю.А.

Целью исследования было изучение содержания нуклеиновых кислот и процессов апоптоза в ткани печени в условиях острого стресса. В гомогенатах печени изучали содержание РНК и ДНК и определяли коэффициент Риглера. Установлено, что содержание РНК в гепатоцитах крыс в условиях острого иммобилизационного стресса уменьшилось в 2,1 раза, а содержание ДНК в 2,3 раза по сравнению с показателями у интактных животных. При стрессе коэффициент Риглера достоверно не изменился по сравнению с интактными животными. Повреждение печени при остром стрессе сопровождалось усилением процессов апоптоза в органе.

**Ключевые слова:** печень, острый стресс, апоптоз.

#### INFLUENCE OF ACUTE STRESS ON THE PROCESSES OF APOPTOSIS AND CONTENT OF NUCLEIC ACIDS IN RATS' LIVER TISSUE Ryabushko M.M., Lutsenko R., Kapustnik Yu.

The research purpose was study of content of nucleic acids and processes of apoptosis in liver tissue in the conditions of acute stress. In liver homogenates content of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid is studied. Rigler coefficient is determined also. It was found out in experimental researches, that in the conditions of acute immobilized stress content of ribonucleic acid in rat hepatocytes is diminished in 2,1 time, and content of deoxyribonucleic acid is diminished in 2,3 time as compared to the indexes of intact animals. In stress the Rigler coefficient did not change as compared to this index of intact animals. In acute stress damage of liver was accompanied by strengthening of processes of apoptosis in organ.

**Key words:** liver, acute stress, apoptosis.

УДК 582.282.23:57.085:615.28

#### АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ АНТИСЕПТИЧНИХ КРАПЕЛЬ

Н.К. Сорокошова

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова, м. Вінниця

Запальні захворювання очей відносяться до найбільш частих причин звернень пацієнтів до лікарів. Однією з найскладніших серед них є широке розповсюдження гнійно-запальних захворювань [4]. Складна екологічна ситуація несприятливо відбивається на