

## НОВЫЙ МЕТОД БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В работе представлен новый метод биотестирования проявления эндогенной интоксикации путем определения действия токсических веществ сыворотки крови на функциональное состояние Т-лимфоцитов по их способности к розеткообразованию. Проявления эндогенной интоксикации в условиях хронического эмоционального стресса у крыс и коррекция данных нарушений слабоминерализованной минеральной водой оценивали при помощи предложенного метода.

**Ключевые слова:** эндогенная интоксикация, хронический эмоциональный стресс, молекулы средней массы, реакция ингибции розеткообразования.

В соответствии с современными представлениями эндогенная интоксикация (ЭИ) рассматривается как неспецифический синдром, развивающийся при разных по этиологии патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями баланса между двумя процессами — скоростью образования и накопления в крови токсических продуктов метаболизма, с одной стороны, и скоростью их нейтрализации и выведения системами эндогенной детоксикации, с другой стороны [12,14].

Наиболее выраженные проявления ЭИ характерны для больных с почечной недостаточностью, сепсисом, ожоговой болезнью, последствиями травм, дерматологическими заболеваниями. Наряду с этим, имеются данные о выявлении ЭИ при ряде хронических процессов [1,2,11,16]. В том числе имеются отдельные сообщения [3] о том, что у спортсменов в период тренировок сопровождающимися признаками хронического стресса (ХС) имеются проявления характерные для ЭИ. Развитие ЭИ при ХС может быть обусловлено повышением процессов катаболизма, ПОЛ, активацией энергетического обмена на фоне снижения функциональной активности иммунной системы, как одной из основных систем эндогенной детоксикации. В ряде экспериментальных исследований [7,13] показано, что ХС сопровождается развитием иммунодефицитного состояния: снижением массы тимуса, лимфопенией и др. В наших экспериментальных исследованиях [4,9] установлено, что у крыс с хроническим эмоциональным стрессом (ХЭС) развиваются проявления ЭИ.

Учитывая полиэтиологичность и полиорганность нарушений, которые приводят к развитию ЭИ, ее диагностика включает огромное количество различных показателей, характеризующих проявления этого синдрома.

Известны способы определения эндогенной интоксикации [15,19,20] основанные на: подавлении скорости оседания эритроцитов крови под влиянием мочи больных с признаками ЭИ; воздействии сыворотки крови на частоту сердечных сокращений лягушки; подавлении дифференцировки активированных ретикулоцитов периферической крови в культуре клеток крыс (тест-РТ) под влиянием сыворотки крови; угнетении подвижности сперматозоидов быка под влиянием мочи больных с признаками ЭИ и др.

Одним из диагностических критериев ЭИ признано [5] определение в крови больных молекул средней массы (МСМ), содержание которых в биологических жидкостях позволяет определить тяжесть, стадию ЭИ и корригировать детоксикационную терапию.

МСМ обладают свойствами неспецифических эндотоксинов с широким диапазоном действия и оказывают токсическое влияние на различные системы организма. МСМ способны блокировать рецепторы любой клетки, негативно влияя на ее метаболизм и функции. Их накопление в крови сопровождается подавлением эритропоэза, угнетением реакции лимфоцитов на стимуляцию ФГА в РБТЛ, ингибцией функциональной активности иммунокомпетентных клеток [6,10].

Предложенный нами метод биотестирования эндотоксикоза в исследованиях *in vitro* основан на токсическом влиянии продуктов метаболизма на иммунокомпетентные клетки.

**Целью** работы было исследование возможности использования теста ингибции розеткообразования для определения интенсивности проявлений ЭИ.

**Материал и методы исследования.** Исследования выполнены на 56 белых крысах линии Вистар с массой тела 180,0-200,0 гр. Животные были разделены на три группы: 1-я группа — крысы с моделью ХЭС; 2-я группа — крысы, получавшие кремниевую с повышенным содержанием органических веществ слабоминерализованную гидрокарбонатную разного катионного состава минеральную воду (МВ) «Березовская» в условиях воспроизведения модели ХЭС, в режиме дозированного поения; 3-я группа — контрольная (интактные животные). МВ вводили, начиная с 15-го дня моделирования на протяжении двух недель, ежедневно, через зонд в объеме 1 % от массы тела животного.

Для воспроизведения модели ХЭС крыс помещали на 3 ч ежедневно на протяжении 30 дней в специальные клетки, устройство которых ограничивало их движения. Дополнительно животных подвергали действию так называемых «ситуационных» стрессоров — смена режима кормления и освещения [17].

Наличие ЭИ у крыс с ХЭС верифицировали по интегральным показателям — уровень МСМ<sub>254</sub>, МСМ<sub>280</sub>, определение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), величины лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ), активности ПОЛ [8], а также теста ингибиции розеткообразования [18]. Изучение проявлений ЭИ проводили на 15-й и 30-й дни моделирования ХЭС.

Принцип метода теста ингибиции розеткообразования состоит в определении действия токсических веществ сыворотки крови на функциональное состояние Т-лимфоцитов по их способности к розеткообразованию. Токсические вещества, находящиеся в сыворотке крови крыс с ЭИ могут блокировать рецепторы Т-лимфоцитов и значительно угнетать их способность к розеткообразованию, т.е. блокировать функциональную активность этих клеток.

Контролем являлось количество интактных Т-лимфоцитов обработанных сывороткой интактных крыс, опытом — количество интактных Т-лимфоцитов обработанных сывороткой животных с ХЭС.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Установлено, что в условиях ХЭС у крыс развиваются проявления ЭИ на 15-е сутки, с наиболее выраженным увеличением интегральных показателей (МСМ<sub>254</sub>, МСМ<sub>280</sub>, ЛИИ) на 30-е сутки моделирования (рис.1).

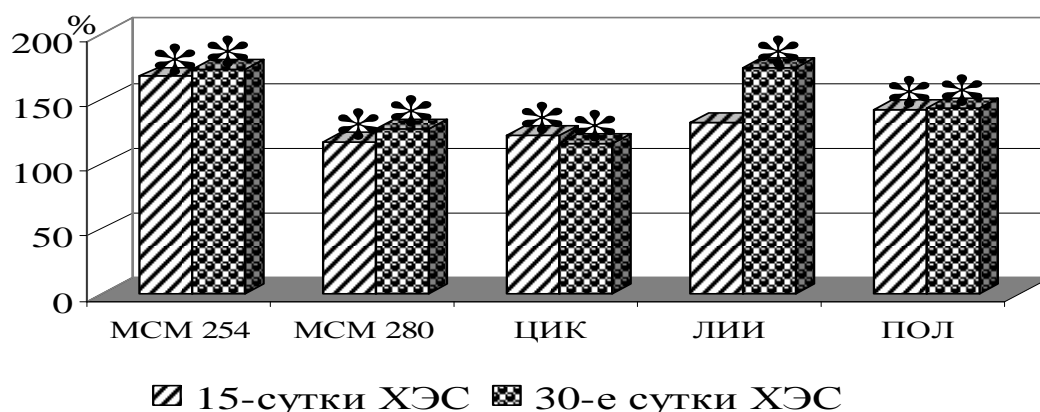


Рис. 1. Динамика маркеров ЭИ на разных этапах развития модели ХЭС. (100 % — уровень показателей у интактных животных, \* — достоверность отличий абсолютных величин,  $p < 0,05$ ).

Обнаружено, что после обработки лимфоцитов интактных крыс сывороткой крови животных 1-й группы, полученной на 15-е и 30-е сутки моделирования ХЭС, существенно снижается способность лимфоцитов к розеткообразованию (табл.1). Количество розеткообразующих Т-лимфоцитов (Т-РОК), обработанных сывороткой 1-й группы, было достоверно ниже ( $p < 0,001$ ) по отношению к количеству Т-РОК обработанных сывороткой 3-й группы.

Таблица 1

**Реакция розеткообразования лимфоцитов интактных животных, обработанных сывороткой крыс 1-й (опыт) и 3-й (контроль) групп, ( $M \pm m$ )**

(контроль)	Количество Т-РОК интактных животных (%):	
	15-й день моделирования	30-й день моделирования
42,5 ± 1,5	32,5 ± 2,0	33,0 ± 1,7
—	$p < 0,001$	$p < 0,001$

P – рассчитан относительно контроля.

Можно предположить, что ингибирующее действие сыворотки крыс с моделью ХЭС на розеткообразующую функцию Т-лимфоцитов обусловлено высоким содержанием продуктов метаболизма характерных для проявления ЭИ.

Разработанный способ может быть применен не только для выявления проявлений ЭИ, но и для контроля эффективности действия различных лечебных факторов в т.ч. природных. Нами выявлено, что внутренний прием МВ «Березовская» на протяжении всего периода воспроизведения модели ХЭС предупреждает развитие ЭИ. Об этом свидетельствует нормализация показателей теста ингибиции розеткообразования (таблица 2). Количество Т-РОК, обработанных сывороткой крыс 2-й группы не отличалось ( $p > 0,5$ ) от показателей 3-й группы.

Таблица 2

**Реакция розеткообразования лимфоцитов интактных животных, обработанных сывороткой крыс 2-й (опыт) и 3-й (контроль) групп, ( $M \pm m$ )**

Количество Т-РОК интактных животных (%):	
(контроль)	(опыт)
42,5 ± 1,5	38,6 ± 1,2
—	$p > 0,5$

P – рассчитан относительно контроля.

**Заключення**

Разработанный метод значительно расширяет арсенал способов диагностики проявлений ЭИ, позволяет получить информацию об ингибирующем действии токсических продуктов на функциональное состояние иммунной системы и может быть использован для оценки эффективности различных методов детоксикации в т.ч. с применением природных факторов.

**Література**

1. Арискина О.Б. Функциональная активность мононуклеаров и нейтрофильных гранулоцитов периферической крови как показатель эндогенной интоксикации при травматической болезни: автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук: спец. 14.00.46 "Клиническая лабораторная диагностика" / О.Б. Арискина // -СПб., 2005.-21 с.
2. Анненкова А.Б. Роль эндогенной интоксикации в нарушении гомеостаз организма человека при хронических дерматозах: автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.13. "Физиология" / А.Б. Анненкова // -СПб., 2006.-22 с.
3. Афанасьева И.А. Иммунный гомеостаз у спортсменов высокой квалификации: автореф. дис. на соискание учен. степени д-ра биол. наук: спец. 03.03.01 «Физиология» / И.А. Афанасьева // - Смоленск, 2012.-32 с.
4. Бахолдина Е.И. Исследование функционального состояния нейтрофильно-макрофагального звена иммунной системы в формировании эндогенной интоксикации при хроническом стрессе у крыс / Е.И. Бахолдина // -Минск : -2012- С. 233-238.
5. Громашевская Л.Л. «Средние молекулы» как один из показателей «метаболической интоксикации» в организме / Л.Л. Громашевская // Лабораторная диагностика. - 1997. - № 1. - С. 11 - 16.
6. Газин И.К. Информативность маркеров в оценке тяжести эндотоксикоза при гнойно-некротических поражениях нижних конечностей у больных диабетом / И.К. Газин // Клиническая лабораторная диагностика.-2008.-№ 12.-С. 17-20.
7. Егоркина С.Б. ДЭНАС: противовоспалительный механизм ДЭНС в условиях стресс-индуцированного иммунодефицита / С.Б. Егоркина, А.В. Сорокин, Е.В. Минаева [и др.] // Рефлексология.- 2006.- № 2.- С. 23-24.
8. Золотарьова Т.А. Методичні рекомендації з методів досліджень біологічної дії природних лікувальних ресурсів та преформованих лікувальних засобів: мінеральні природні лікувально-столові та лікувальні води, напої на їхній основі; штучно-мінералізовані води; пелоїди, розсоли, глини, воски та препарати на їхній основі / Т.А. Золотарьова, Б.А. Насибуллін, Н.О. Алексєнко // - К., -2009,- 118 с.
9. Золотарева Т.А. Исследования проявлений эндогенной интоксикации в условиях экспериментального хронического стресса / Т.А. Золотарева, Е.С. Павлова, Б.А. Насибуллин [и др.] // Физиотерапевт.-2011.-№ 6.-С. 20-27.
10. Кишкун А.А. Значение средних молекул в оценке уровня эндогенной интоксикации (обзор литературы) / А.А. Кишкун, А.Д. Кудинова, А.Д. Офитова [и др.] // Военно-медицинский журнал.-1990.- № 2.-С. 41-49.
11. Ковалев Г.И. Взаимосвязь эндогенной интоксикации и иммунодепрессии в патогенезе черепно-мозговой травмы / Г.И. Ковалев, А.М. Томников, Г.Г. Музлаев // -1995.-№ 6.-С. 4-5.
12. Малахова М.Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме / М.Я. Малахова // - 2000.-Т. 6, № 4.-С. 3-14.
13. Мураева Н.А. Возрастные аспекты иммуномодуляционных изменений при хроническом стрессе / Н.А. Мураева, М.Ю. Капитонова, А.И. Краюшкин [и др.] // Фундаментальные исследования.-2006.-№ 5.-С. 64-65.
14. Матвеев С.Б. Оценка эндогенной интоксикации по показателям среднемолекулярных пептидов при неотложных состояниях / С.Б. Матвеев, Н.В. Федорова, М.А. Годков // -2009.-№ 5.- С. 16-18.
15. Неустоев Г.В. Новые методы оценки тяжести эндогенной интоксикации у хирургических больных / Г.В. Неустоев, И.В. Ярема, Д.Г. Неустоев [и др.] // Вестник хирургии.-1998.-№ 3.- С. 30-33.
16. Прокопец О.Н. Иммунологическая реактивность и кислородный бюджет при эндогенной интоксикации у больных с ожоговой болезнью и пути повышения эффективности интенсивной терапии: автореф. дис. на соискание учен. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.37 «Анестезиология и реаниматология» / О.Н. Прокопец // - СПб., 1991.-33 с.
17. Патент № 61221 Україна МПК G 09B 23/28. Спосіб моделювання хронічного стресу / Золотарева Т.А., Насибуллін Б.А., Алексєнко Н.А., Гуца С.Г., Бондар І.В., Іванова А.В., Ярошенко Н.А.; заявник та патентовласник Укр. НДІ МР та К. — № 201015935; заявлено 29.12.2010, опубл. 11.07.2011, Промислова власність № 13.
18. Патент №71656 Україна МПК G 01N 33/50. Спосіб діагностики ендогенної інтоксикації / Золотарева Т.А., Павлова О.С., Бахолдіна О.І., Олешко О.Я., Родомакін М.В.; заявник та патентовласник Укр. НДІ МР та К. — № 201114809; заявлено 13.12.2011, опубл. 25.07.2012, Промислова власність № 14.
19. Тогойбаев А.А. Способ диагностики эндогенной интоксикации / А.А. Тогойбаев, А.В. Кургузкин, И.В. Рикун [и др.] // Лабораторное дело.-1988.-№ 9.-С. 22-24.
20. Чикина Н.А. Ретикулоцитарный тест определения токсичности крови у больных диабетическими ангиопатиями нижних конечностей / Н.А. Чикина // -М.- 1993. - С. 46-51.

**Реферати**

**НОВИЙ МЕТОД БІОТЕСТУВАННЯ ПРОЯВ ЕНДОГЕННІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ**

**Бахолдіна О.І., Золотарьова Т.А., Олешко О.Я.**

В роботі представлений новий метод біотестування прояви ендогенної інтоксикації шляхом визначення дії токсичних речовин сироватки крові на функціональний стан Т-лімфоцитів по їх здібності до розеткоутворення. Прояви ендогенної інтоксикації в умовах хронічного емоціонального стресу у щурів та корекція даних порушень слабкомінералізованою мінеральною водою оцінювали за допомогою запропонованого методу.

**Ключові слова:** ендогенна інтоксикація, хронічний емоціональний стрес, молекули середньої маси, реакція інгібіції розеткоутворення.

Стаття надійшла 29.08.2013 р.

**NEW METHOD OF BIOTESTING FOR ENDOGENOUS INTOXICATION**

**Bakholdina E.I., Zolotareva T.A., Oleshko A.Ya.**

In this work presents a new method of biotesting for endogenous intoxication by determining the action of toxic substances in the blood serum of the functional state of T-lymphocytes by their ability to rosette. The manifestations of endogenous intoxication in chronic emotional stress in rats and correction of the violations brackish mineral water was assessed using the proposed method.

**Key words:** endogenous intoxication, chronic emotional stress, high molecular weight, the reaction inhibition of plaque.

Рецензент Запорожець Т.М.