

ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 616.438-091.8-003.9:616-001.17:616-092.4

КЛІТИННА СМЕРТЬ ТА КЛІТИННИЙ ЦИКЛ В ТИМУСІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ОПІКОВІЙ ХВОРОБІ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ЇЇ ЛІКУВАННЯ ШЛЯХОМ ІНФУЗІЇ КОМБІНОВАНИХ ГІПЕРОСМОЛЯРНИХ РОЗЧИНІВ



Черкасов Ельдар Вікторович
xthrfcjd@bigmir.net

Черкасов Е.В.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Резюме. У статті представлені результати дослідження клітинної смерті показників кінетики клітинного циклу клітин тимуса щурів з опікової хвороби після термічного опікового пошкодження шкіри на фоні застосування 0,9% розчину NaCl, препаратів лактопротеїн з сорбітолом або HAES-LX5%. Опікове ушкодження шкіри на фоні застосування 0,9% розчину NaCl призводить до порушень клітинного циклу клітин тимуса, максимально вираженого через 1 і 3 добу спостереження. Застосування препаратів лактопротеїн з сорбітолом або HAES-LX-5% дозволяє істотно поліпшити показники клітинного циклу клітин тимуса і зменшити негативний вплив опікового пошкодження: лактопротеїн з сорбітолом за рахунок впливу на синтез ДНК (фазу), а препарату HAES-LX-5% на апоптоз, що проявляється зменшенням фрагментації ДНК (SUB-G0G1).

Ключові слова: тимус, клітинна смерть, клітинний цикл, опікова хвороба, ДНК-цитометрія, лактопротеїн з сорбітолом, HAES-LX-5%.

Вступ. Важка опікова травма призводить як до місцевих, так і до загальних порушень в системі обміну речовин, природної резистентності, імунологічної реактивності [3]. При опіковій хворобі в крові накопичуються циркулюючі імунні комплекси внаслідок пошкодження механізмів їх виведення із організму обпеченого. Це є причиною порушення нормальної функціональної активності імунокомпетентних клітин, а також їх токсичного ушкодження. Саме тому опікову хворобу розглядають як захворювання із вторинною імунологічною недостатністю, при якому особливо пригнічуються клітинні механізми захисту [12].

Доведено, що успіх лікування опікової хвороби залежить від своєчасності та тривалості фармакотерапії, спрямованої на гальмування генералізованої катаболічної реакції в осередку травми та в усіх внутрішніх органах, на оптимізацію перебігу системної запальної та апоптозної відповідей, попередження ендогенної інтоксикації та поліорганної дисфункції, забезпечення гомеостазу та імуно-

корекції [1, 2]. Саме тому, обов'язковою складовою комплексного лікування опікової хвороби клініцисти [3] вважають внутрішньовенну інфузію препаратів дезінтоксикаційної та реологічної дії.

Метою дослідження було оцінити динаміку клітинної смерті та клітинного циклу в тимусі при експериментальній опіковій хворобі у щурів за умов її лікування шляхом внутрішньовенної інфузії розчинів лактопротеїну з сорбітолом і HAES-LX-5%.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження виконано на 226 білих щурах-самцях масою 155-160г. Утримання та будь-які маніпуляції з тваринами здійснювали у повній відповідності до вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), з неухильним дотриманням рекомендацій «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), положень «Правил доклінічної оцінки

безпеки фармакологічних засобів (GLP)» [129] та правил гуманного ставлення до експериментальних тварин, що затверджені комітетом з біоетики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 56 від 29 червня 2011 року).

Дослідні тварини були розділені на 7 груп: I – інтактні тварини; II, III, IV – щури без термічної травми, яким проводилась окрема внутрішньовенна інфузія 0,9% розчину NaCl, лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% відповідно у дозі 10 мл/кг щоденно упродовж 7 діб; V, VI, VII – тварини з опіком, яким за аналогічною схемою та у такому ж дозовому режимі проводили окреме введення досліджуваних речовин.

Усім щурам перед моделюванням патологічного стану голили бічні поверхні тулуба механічною машинкою та безпечною бритвою. Опікову травму викликали шляхом прикладання до бічних поверхонь тулуба тварин чотирьох мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку, площа поверхні кожної пластинки складала 13,86 см²), які попередньо тримали протягом 6 хвилин у воді з постійною температурою 100 °C. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складала 21-23 % поверхні тіла, експозиція становила 10 с, що є цілком достатнім для формування опіку II-III ступеня, розвитку шокowego стану середнього ступеня важкості та ініціації опікової хвороби.

Збір матеріалу для морфологічного дослідження проводився під глибоким тіопенталовим внутрішньочеревним наркозом через 1, через 3, через 7, через 14, через 21, через 30 діб після нанесення експериментальної опікової травми шкіри. У тварин після декапітації робили розтин грудної порожнини і після вилучення тимуса вирізали за допомогою леза невеликі тканинні блоки. У подальшому одержаний матеріал обробляли за загальноприйнятими методами.

Для гістологічного дослідження тканинні блоки тимуса фіксували в 10 % розчині нейтрального формальдегіду. Після фіксації матеріал промивали, зневоднювали в серії спиртів, що відзначались зростаючою концентрацією, проводили через хлороформ та заливали у парапласт. Гістологічне дослідження тимуса здійснювали на мікроскопі Olympus BX51.

Для електронномікроскопічного дослідження щурів під глибоким тіопенталовим внутрішньочеревним наркозом проводили розтин черевної порожнини. Шматочки тимуса розрізали на невеликі блоки. Після стандартної фіксації та провідки матеріал заливали в суміш аралдиту з епоксидними смолами.

Подальші етапи електронномікроскопічного дослідження були виконані на базі відділу електронної мікроскопії Інституту проблем патології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Напівтонкі та ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі LKB-3 (Швеція). Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім та метиленовим синім – азур II. Ультратонкі зрізи контрастували на мідних опорних сіточках уранілацетатом і цитратом свинцю за Рейнольдсом. Процес фотографування під час проведення електронномікроскопічного дослідження проводили на електронному мікроскопі ПЕМ-125К.

Експериментальне дослідження впливу інфузійних розчинів на показники клітинного циклу і фрагментації ДНК клітин тимуса виконано методом проточної цитометрії на 108 щурах-самцях з опіковою травмою шкіри (та на 108 відповідних тваринах без опіку шкіри).

Суспензії ядер з клітин тимуса отримували за допомогою спеціального розчину для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA фірми Partec, Німеччина, відповідно до протоколу-інструкції виробника. Зазначений розчин надає можливість швидко і одночасно виконувати екстракцію ядер та маркувати ядерну ДНК діамідінофеніліндолом (DAPI), який входить до його складу. У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались спеціальні одноразові фільтри CellTries 50 мкм (Partec, Німеччина). Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec, Німеччина, на базі науково-дослідного центру Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова.

Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось ультрафіолетове випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 20 тис. подій. Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) у повній цифровій відповідності згідно з математичною моделлю, де визначались:

G0G1 – відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2с);

S – відсоткове співвідношення фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2с та < 4с);

G2 + M – відсоткове співвідношення фази G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4с);

IP – індекс проліферації, який визначається за сумою показників S + G2 + M;

BP – блок проліферації, який оцінюється за співвідношенням S/(G2 + M) (збільшення числа клітин в фазі G2 + M при низьких значеннях S-фази свідчить про затримку проліферації в стадії G2 + M).

Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах RN1 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2с.

Статистична обробка отриманих результатів проведена у пакеті "STATISTICA 6.1" (належить науково-дослідному центру Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, ліцензійний № BXXR901E246022FA) із застосуванням процедур описової статистики та параметричних і непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Аналізували правильність розподілу ознак за кожним із отриманих варіаційних рядів, середні значення кожної ознаки, що вивчалася, та стандартне квадратичне відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за критерієм Стьюдента, в інших випадках – за допомогою U-критерію Мана-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Нами вперше проведено співставлення інтегральних показників клітинного циклу в тимусі із морфологічною картиною ушкодження

клітин на фоні опікового ураження шкіри, і, зокрема, що стосується активації апоптоза та гальмування клітинного поділу, яке полягає у зменшенні числа клітинних подій в фазі G2 + M ($p=0,03$), та, особливо, підвищенні числа подій в інтервалі SUB-G0G1 ($p=0,004$) через добу після опіку. Зафіксовані нами показники клітинного циклу в тимусі у тварин без опікового ушкодження вказують на сталу картину, що характеризується балансом між синтезом та апоптозом із невисокими показниками фази S ($8,925\pm 2,654\%$), та інтервалу SUB-G0G1 ($2,608\pm 0,536\%$), із високою кількістю клітин, що знаходяться в неактивному стані G0G1 ($70,32\pm 4,66$).

Hobson K.G. et al. [7] пояснювали даний факт прямим негативним впливом медіаторів запалення (зокрема фактору некрозу пухлини) на клітинний поділ тимоцитів, що викликає порушення синтетичних внутрішньоклітинних процесів. Вказані автори підтверджували зниження синтезу ДНК методом фіксації мітки Kі-67. На їх думку саме це порушення диференціювання може бути ключовим щодо реалізації імунодепресивного впливу опікової хвороби на тимус. З іншого боку в даному дослідженні не розглядалися показники апоптоза усіх функціонально різних клітин тимуса, що, на наш погляд, не дозволяє в повному об'ємі й всебічно оцінити порушення клітинного циклу, хоча авторами припускається подібний вплив.

Загалом, активація апоптоза при опіковому ушкодженні є достатньо вивченим явищем для багатьох органів і тканин, вона розглядається як механізм регуляції гомеостазу, який на фоні опікової хвороби може бути суттєво порушеним [10].

Так Hobson K.G. et al. [7] встановили, що при опіку реєструються 12,8 % клітин тимуса з ознаками апоптоза проти 6,4 % у групі контролю. В нашій групі спостереження кількість клітинних подій в інтервалі SUB-G0G1 склала $11,90\pm 4,46$ після опіку шкіри, що суттєво перевищувало відповідний показник у тварин без опікового ураження ($2,608\pm 0,536$). Різницю з іншими спостереженнями можна пояснити різними методиками оцінки апоптоза (гістологічними, імуногістохімічними, імунофенотипуваннями), але варто зазначити, що за сучасними уявленнями дослідження інтервалу SUB-G0G1 (фрагментації ДНК) є найбільш надійним і загальноприйнятим методом оцінки апоптоза.

Варто зазначити що регуляція апоптоза тимоцитів на фоні опіку має свої особливості, які є предметом детального вивчення. Так, відомо [8, 9], що саме кортикостероїди а не FasL відповідають за посилення активації каспази-3 в перший день опіку. Також важливу роль в активації апоптоза клітин тимуса приділяють ендотоксинам, що активують різноманітні цитокіни, такі, зокрема, як трансформуючий фактор росту – бета (TGF-бета), що реалізує свою активність при наявності факторів транскрипції Smad 2 и Smad 3, які опосередковують ефекти вищезгаданого цитокіну [7].

На важливість ролі в запуску апоптоза вказує і встановлене нами суттєве зменшення клітин, які реєструються в інтервалі SUB-G0G1, на фоні застосування препарату HAES-LX-5% ($7,588\pm 1,156$) та тенденція до зменшення цього показнику ($8,458\pm 1,178$) при застосуванні лактоп-

ротейну з сорбітолом. Можемо припустити що застосування цих препаратів знижує активність цитокінів-прогеніторів апоптоза, що масово виділяються при опіковому пошкодженні клітин. Також важливим фактором анти-апоптозної дії цих засобів вірогідно є зниження рівня глюкокортикоїдів, які, за сучасними даними, відіграють основну роль в регуляції апоптоза тимоцитів. Тобто, ймовірний шлях протективної дії препарату HAES-LX-5% на клітини тимуса співпадає із основними патогенетичними ланками ушкодження даного органу при опіках (який, головним чином, полягає у надмірній активації апоптоза).

Зазначимо, що на сьогодні існує загальноприйнята думка – якщо клітина при патологічному процесі гине шляхом апоптоза, то терапевтична корекція цього процесу можлива, якщо клітина гине від некрозу – ні [11]. В комбустіології активно проводиться пошук терапевтичних засобів які б регулювали патологічний запуск апоптоза при опіковій хворобі (олігопептиди, інгібітори протеаз, регулятори активності апоптоз-регулюючих генів) і підкреслюється важливість подальшого вивчення морфологічних та біохімічних маркерів апоптоза. Але в жодному дослідженні присвяченому експериментальному вивченню препаратів та засобів, що впливають на імунітет і, зокрема, на тимус – Т-активін, вілон, трансплантація культивованих аллофібробластів [10]; не проводилось цільове вивчення апоптоза на фоні застосованої терапії, хоча морфологічно описуються його ознаки. Нами вперше проведено динамічне спостереження за основними показниками клітинного циклу на фоні застосування корегуючих препаратів лактопротейну з сорбітолом та HAES-LX-5%.

При дослідженні впливу даних препаратів на інші показники клітинного циклу нами була виявлена певна специфічність. Через добу після опіку шкіри нами встановлено виражену тенденцію ($p = 0,055$) відмінностей в показниках фази G0G1 між групами опік + 0,9 % розчин NaCl та опік + лактопротейн з сорбітолом, що може свідчити про направленість дії саме цього препарату на стимуляцію синтетичних процесів в клітинах тимуса. В меншому ступені така дія притаманна препарату HAES-LX-5%, на що вказує однакова позитивна динаміка показників індексу проліферації групи опік + лактопротейн з сорбітолом ($21,72\pm 3,60$; $p<0,05$) та групи опік + HAES-LX-5% ($20,88\pm 5,42$; $p<0,05$), відносно цього ж показника в групі опік + 0,9 % розчин NaCl. Порівняння показників індексу проліферації на фоні опікового ушкодження та застосування корегуючої терапії проведено вперше. На нашу думку, цей показник може бути індикаторним показником ефективності протекторного впливу при оцінці ефективності дії застосованого лікування на клітини тимуса при опіковому ураженні.

Через 3-и доби після опіку в групі опік + 0,9 % розчин NaCl в показниках клітинного циклу відбувається поступова нормалізація основних показників клітинного циклу клітин тимуса. Однак, показник фази S ($12,54\pm 3,48\%$) статистично значуще на 140 % більше, ніж аналогічний в групі без опікового ураження, що підтверджує наявність блоку синтезу ДНК. Отримані нами дані вказують на збе-

реження пошкоджуючого впливу чинників опікової хвороби на тимус із порушенням клітинного циклу тимочитів через 3 доби після опіку шкіри і застосування 0,9 % розчину NaCl.

Показник інтервалу SUB-G0G1, навіть через 3 доби після опіку перевищував аналогічні у групі тварин без опіку в 4,6 разів, що свідчить про збереження та високу інтенсивність апоптоза клітин тимуса в цей час спостереження, не зважаючи на відновлення інших показників клітинного циклу. Основна роль апоптоза в реалізації патологічного впливу чинників опікової хвороби на тимус встановлена гістологічними методами та методом імунофенотипування [6, 10] і підтверджена в нашому дослідженні найбільш точною на сьогодні методикою проточної ДНК-цитометрії, яка вважається еталонною, щодо реєстрації апоптоза [6].

На фоні збереження знижених показників фази S в групі опік + 0,9 % розчин NaCl у групі опік + лактопротеїн з сорбітолом та опік + HAES-LX-5% відбулось підвищення рівня даного показника, який не відрізнявся від показника групи тварин без опіку ($p > 0,05$). Нами виявлено, що при застосуванні лактопротеїну з сорбітолом S-фаза суттєво відрізняється від аналогічного показника в групі опік + 0,9 % розчин NaCl ($p < 0,05$), що може вказувати на певну особливість реалізації позитивного впливу цього препарату в післяопіковий період на синтез ДНК в ядрах клітин тимуса. Підвищення рівня клітин в фазу S вказує на можливість швидкого відновлення кількості клітин та їх субпопуляцій і на потенційне відновлення функціонування органу.

У групі тварин, де застосовувався препарат HAES-LX-5%, більш значимими виявились зміни показників SUB-G0G1 – кількість клітин з фрагментованою ДНК була значно більшою, ніж в групі без опіку, але в 2 рази меншою за аналогічні показники групи з опіком на тлі корекції 0,9 % розчином NaCl ($p < 0,05$). Це свідчило про здатність HAES-LX-5% захищати клітини тимуса від проапоптичного впливу опікового ураження. Для групи опік + лактопротеїн з сорбітолом динаміка показників інтервалу SUB-G0G1 мала той же самий напрям однак без статистично значущих відмінностей із показниками групи опік + 0,9 % розчин NaCl ($p > 0,05$). Можемо припустити, що кожен із препаратів - лактопротеїн з сорбітолом та HAES-LX-5% мають специфічну дію відносно впливу на фази клітинного циклу в тимусі. Так, для лактопротеїну з сорбітолом більш характерним виявився стимулюючий вплив на S фазу, а для HAES-LX-5%, – гальмування патологічного апоптоза на фоні опікового ушкодження шкіри.

Вартим обговорення є також встановлене нами практично повне відновлення через 7 днів після опіку шкіри, на фоні застосування 0,9 % розчину NaCl, показників інтервалу SUB-G0G1 відносно аналогічних показників групи без опіку ($p > 0,05$). Можемо припустити, що після зникнення ендотоксикозу зникають явища стимуляції апоптоза клітин тимуса, що в подальшому має призвести до ліквідації T-клітинного імунodefіциту. Загальновідомо, що одночасно із цим, на рівні клітин та тканин спостерігається картина опікового ураження тимуса і зниження його функціональних властивостей. Так, за клінічним да-

ними [3] саме з 10-12 доби при опіковій хворобі настає стадія септикотоксемії, коли на фоні посилення токсемії та імунodefіциту розвиваються септичні ускладнення, поліорганна недостатність, септичний шок. Є підстави вважати, що виявлені нами позитивні ознаки відновлення клітинного циклу в тимусі після опіку є недостатніми для компенсації і повного відновлення T-клітинної ланки імунітету і, відповідно, є недостатніми для попередження розвитку інфекційних ускладнень. Тому, є необхідність у продовженні терапії направленої на більш суттєве відновлення функціонування тимуса та наступну ліквідацію клінічно важливої імунodefіресії.

При застосуванні HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом через 7 днів після опіку шкіри відносно основних показників клітинного циклу спостерігалась подібна картина до зафіксованої у групі опік + 0,9 % розчину NaCl: відбулось відновлення показників клітинного циклу (G0G1, G2 + M та S) до значень аналогічних показників групи без опіку і не виявлено статистично значущої різниці із ними. Однак, при аналізі відновлення інтервалу SUB-G0G1 у групі опік + HAES-LX-5% зафіксовано суттєве покращення цього показника відносно групи опік + 0,9 % розчин NaCl ($p < 0,05$), що свідчить про більш вагомий вплив даного препарату на апоптоз клітин тимуса. Зафіксований позитивний вплив препарату HAES-LX-5% на 3-й та 7-й день спостереження після опікового ураження шкіри, свідчить про його антиапоптотичний ефект.

Результати наших досліджень показали, що через 14 днів після опікового ураження шкіри відбулась суттєва нормалізація показників клітинного циклу в тимусі у групі опік + 0,9 % розчин NaCl (G0G1, G2 + M та S-фаза, індекс проліферації та інтервал SUB-G0G1) відносно показників групи без опікового ушкодження. Подібна картина у цей же період на фоні опіку спостерігалась, за даними інших дослідників [7], у вигляді поступового відновлення морфологічної картини щодо регенерації тимуса і показників T-клітинного імунітету. В цей же період після опіку відбувається запально-регенераторна стадія змін раньової поверхні, що асоціюється із поступовим відновленням клітин тимуса за рахунок їх проліферації.

Таким чином, в результаті наших досліджень встановлено, що на фоні застосування лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% через 14 днів після опікового ураження шкіри відбувається відновлення всіх показників клітинного циклу в тимусі, позитивна оцінка яких може бути прийнята з певними застереженнями.

Як відомо [3], при опіковій хворобі саме на 10-12 день виникають репараційні порушення, що є наслідком дисбалансу між підвищеною потребою в організмі пластичних елементів та запасом енергетичних ресурсів (цей дисбаланс посилює токсичне пошкодження органів та систем). Є підстава вважати, що саме через 14 днів після опіку шкіри є загроза виникнення найбільшого дисбалансу між потребами організму і надходженням поживних речовин, якщо на фоні зменшення токсичного впливу не спостерігається значного оновлення клітинної популяції, що може призвести до зменшення антиоксидантного ефекту лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5%.

Опосередковано на користь нашого припущення свідчить подальша динаміка показників клітинного циклу на фоні опіку. Через 21 та 30 днів після опіку шкіри нами зареєстровані певні відмінності в показниках клітинного циклу після дії препаратів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом, які відрізнялись від аналогічних в групі опік + 0,9 % розчин NaCl. В групі опік + 0,9 % розчин NaCl в терміни через 21-у та 30-у добу спостереження основні показники клітинного циклу відповідали значенням аналогічних показників контрольної групи (без опіку). Відновлення клітинного циклу в тимусі відбулось в повному об'ємі вже через 21-у добу спостереження за рахунок зменшення показника інтервалу SUB-G0G1, який статистично значуще відрізнявся від цього ж показника, зафіксованого через одну добу після опіку ($p=0,04$), та індексу проліферації ($p=0,078$), а показники фази S ($p=0,058$) і фази G0G1 ($p=0,078$) мали лише тенденцію до збільшення в порівнянні із аналогічними показниками клітинного циклу, отриманими через 1 добу після опіку шкіри на фоні лікування 0,9 % розчином NaCl.

Таким чином, застосування лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% виявили певні особливості довготривалого впливу (навіть після закінчення введення препаратів). Зокрема, вони полягали у встановленій тенденції на 21 добу ($p=0,0574$) до збільшення клітин в фазі S в групі опік + HAES-LX-5% та суттєвому зменшенні клітин в фазу G0G1 ($p=0,0374$) і індексу проліферації ($p=0,0374$) в цій же групі, в порівнянні з показниками групи опік + 0,9 % розчин NaCl. Для групи опік + лактопротеїн з сорбітолом різниці показників із показниками групи опік + 0,9 % розчин NaCl не виявлено ($p>0,05$). Через 30 днів після опіку шкіри в групі опік + HAES-LX-5% було виявлено тенденцію до зменшення кількості клітин, які перебувають в фазу G0G1 ($p=0,782$) та в інтервалі SUB-G0G1 ($p=0,782$), що знову ж вказує на певні відмінності впливу двох досліджуваних препаратів. Можемо стверджувати про більш стійкий та тривалий позитивний вплив від застосування

HAES-LX-5% на клітинний цикл в тимусі. Реалізація цього впливу має відтермінований ефект, який полягає у стимуляції синтетичних внутрішньоклітинних процесів та гальмуванні апоптоза.

Підсумовуючи та аналізуючи отримані дані і порівнюючи їх із раніше відомими, можемо відмітити особливості впливу опікового uszkodження на клітини тимуса, які полягають у суттєвому збільшенні кількості клітин в інтервалі SUB-G0G1 в 4,6 рази, та, відповідно, суттєвому зменшенні клітин, які перебувають в фазу S ($p=0,01$), що свідчить про недостатнє відновлення популяції пошкоджених клітин, як і зменшення індексу проліферації - IP ($p=0,04$)

Нами встановлено, що у всіх лікованих тварин через 7, 14, 21 та 30 днів після опіку шкіри всі показники клітинного циклу істотно не відрізнялись від аналогічних показників групи без опіку. Однак, відмічались і певні особливості, які вказують на неповне відновлення клітинного циклу на фоні застосування 0,9% розчину NaCl – через 30 днів після опіку шкіри, коли виявилась відмінність показників з показниками через 1 добу після опіку: фази G0G1 ($p=0,037$), індексу проліферації IP ($p=0,037$) та інтервалу SUB-G0G1 ($p=0,04$).

Для опікового ураження клітин тимуса є більш характерним uszkodження на рівні синтезу ДНК і посилення апоптоза (рис. 1).

Можемо зробити висновок про позитивний ефект застосування лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% на клітинний цикл клітин тимуса, який більше виражений на фоні застосування HAES-LX-5% ніж лактопротеїну з сорбітолом, у вигляді більш значного антиапоптозного ефекту (рис. 2). Особливістю впливу препарату HAES-LX-5% на клітини тимуса при опіковому ураженні є суттєве зниження апоптоза із збереженням синтетичної функції клітин. Про це свідчить динаміка показників фази S та інтервалу SUB-G0G1 протягом 30 днів спостереження. При застосуванні лактопротеїну з сорбітолом більш ви-

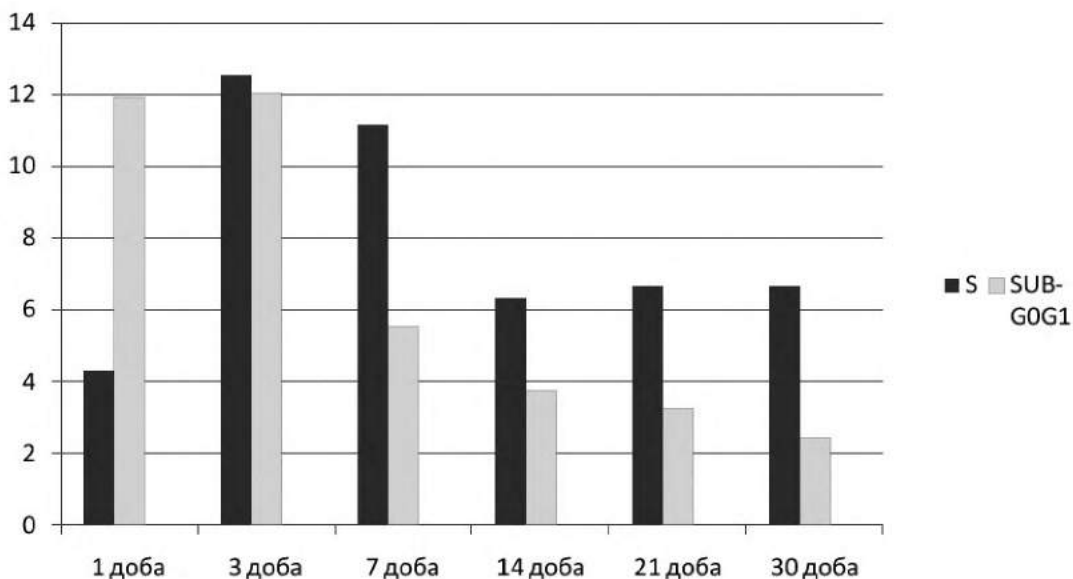


Рис. 1. Динаміка показників фази S та інтервалу SUB-G0G1 на фоні опіку+ 0,9 % розчин NaCl.

раженим виявився ефект на фазу S, особливо через 1 добу після опікового ураження шкіри.

Отримані нами дані про особливості впливу опікової хвороби на клітинний цикл в тимусі дозволяють зробити висновок про наявність значного ушкодження кінетики клітинного циклу на фоні лікування 0,9% розчином NaCl, яке поступово зникає протягом тривалого часу (7 діб). На відміну від цього застосування препаратів лактопротеїну з сорбітолом і HAES-LX-5% дозволяє суттєво (і своєчасно) покращити показники клітинного циклу в тимусі і зменшити негативний вплив опікового ушкодження.

Варто порівняти одержані результати ДНК-цитометрії клітин тимуса з даними ДНК-цитометрії клітин інших органів, одержаних при використанні тотожної моделі експериментальної опікової хвороби [4, 5]. Виявлене при цьому порівнянні співпадіння (і певна різниця) показників клітинного циклу та фрагментації ДНК свідчить: 1) про органну специфічність деструктивних та репаративних процесів; 2) про залучення, що найменше, частини внутрішніх органів до «systemic apoptotic response after thermal burn» [10] за умов даної експериментальної опікової хвороби та при її інфузійній терапії.

За даними ДНК-цитометрії [5] опікове пошкодження супроводжується ураженням клітинного циклу у вигляді збільшення кількості клітин печінки в інтервалі Sub-G1, що наростає через 3 доби і зберігається значно вищим від контролю через 7 доби експерименту. Застосування препаратів HAES-LX-5% і лактопротеїну з сорбітолом покращує показники клітинного циклу клітин печінки на фоні опікового ураження у вигляді стійкого зниження кількості клітин, які перебувають в інтервалі Sub-G1, та зменшення клітинного блоку проліферації S/G2M, що більш яскраво реалізується на фоні застосування препарату HAES-LX-5% через 3 і 7 діб експерименту.

Під час визначення [6] особливостей клітинного циклу та фрагментації ДНК в клітинах легень встановлено, що у щурів, яким після термічної травми вводили 0,9% розчин NaCl, через 14, 21 і 30 діб після опіку шкіри II-III ступеня спостерігаються ознаки індукції процесів апоптозу, порушень синтезу ДНК та проліферативної активності клітин легень. В результаті застосування інфузійних колоїдно-гіперосмолярних розчинів лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% через 14 діб після опікового ушкодження шкіри реєструються ознаки покращення показників клітинного циклу в легенях, провідними проявами яких є суттєве зменшення показників фази S, IP, інтервалу SUB-G0G1 та величин BP ($p < 0,05$). Через 30 діб після опіку у щурів на фоні введення розчинів лактопротеїну з сорбітолом або HAES-LX-5% всі показники клітинного циклу не мають відмінностей у порівнянні з аналогічними показниками групи тварин без опікового ураження шкіри, причому антиапоптозний вплив розчину HAES-LX-5% є найбільш вираженим.

При опіковій хворобі нами виявлені структурні свідчення порушення перебігу апоптозу як фізіологічного явища, яке забезпечує селекцію тимоцитів та усунення інших клітин тимуса, що закінчили свій життєвий цикл. Є підстави вважати, що зусилля лікарів щодо корекції імунологічного стану хворих при опіковій хворобі повинні бути спрямовані не на індукцію проліферативної активності клітин тимуса, та пригнічення їх апоптозу, а на широкі впровадження і застосування модуляторів апоптозу та інгібіторів некрозу в опікових центрах.

Отримані нами дані щодо застосування лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% для лікування опікової хвороби свідчать, що дія цих препаратів не обмежується тільки тими їх фізико-хімічними властивостями, які забезпечують дезінтоксикаційні та реологічні ефекти. Перс-

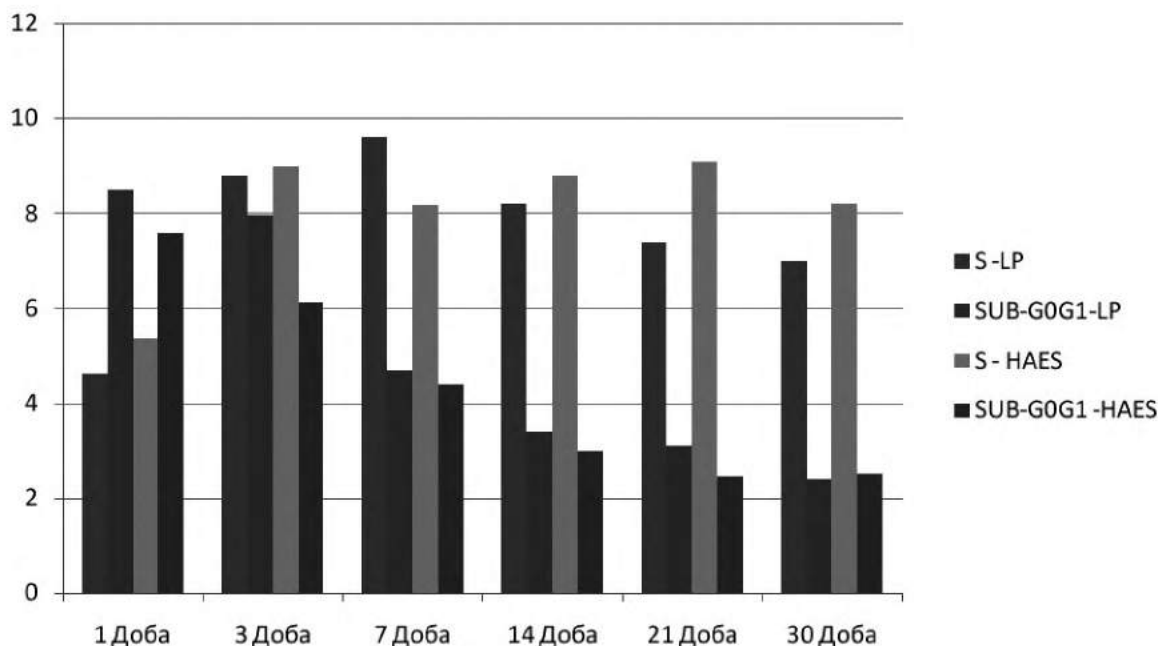


Рис. 2. Динаміка показників фази S та інтервалу SUB-G0G1 на фоні опіку + лактопротеїну з сорбітолом (LP) та опіку + HAES-LX-5% (HAES).

пектива подальших досліджень у данному напрямку полягає у дослідженні тих властивостей лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5%, які обумовлюють їх виразний довготривалий вплив на репаративні процеси в тимусі при опіковій хворобі. Ці препарати (які запобігають деструкції та сприяють репарації) можна віднести до групи «пластичних» і застосовувати як засоби відновлювальної терапії при лікуванні захворювань та гострих загрозливих станів, що супроводжуються появою дефектів цілісності судинної стінки та дефектів тканин.

ВИСНОВКИ

1. Співставлення морфологічних (світлова та електронна мікроскопія) даних з результатами проточної ДНК-цитометрії свідчить, що динаміка типів клітинної смерті в тимусі при опіковій хворобі за умов застосування інфузії 0,9% розчину NaCl (контроль), лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% є відзеркалення дуалістичного процесу – «дисфункції/поновлення функції апоптоза» як механізму регуляції генетичного гомеостазу в тимусі.

2. За даними ДНК-цитометрії опікове ураження шкіри у групах щурів через 1 добу після опікової травми на фоні лікування 0,9% розчином NaCl супроводжується змінами проліферативної активності тимуса у вигляді збільшення кількості клітин з фрагментованою ДНК (апоптоз) в 4,6 разів та пригнічення синтезу ядерної ДНК (фаза S) ($p=0,01$), а також зменшення індексу проліферації (IP) ($p=0,04$). Через 3 доби після опікового ураження шкіри на фоні лікування 0,9% розчином NaCl відмічається зменшення показників фази G0G1 ($p=0/0065$), збільшення кількості клітин в S фазі ($p=0,004$) та зменшення клітин із ознаками фрагментації ДНК (SUB-G0G1) ($p=0,04$).

3. Застосування лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% позитивно впливає на кінетику клінічного циклу в тимусі з 1 доби після опікового ураження у вигляді зменшення фрагментації ДНК, особливо в групі опік + HAES-LX-5% ($p=0,0163$). На фоні опікового ураження шкіри та застосування лактопротеїну з сорбітолом через 3 доби спостереження показники S фази суттєво відрізнялись ($p=0,0374$) від аналогічних показників в групі опечених тварин, лікованих 0,9% розчином NaCl. На тлі застосування препарату HAES-LX-5% після опіку шкіри статистично значуще знижуються показники фрагментації ДНК (апоптоза) на 1, 3, 7 добу після опікового ушкодження і ця тенденція зберігається на 14, 21, 30 добу експериментального дослідження відносно аналогічного показника групи тварин, лікованих 0,9% розчином NaCl.

Конфлікт інтересів.

Автор заявляє, що не має конфлікту інтересів, який може сприятися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерела фінансування.

Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Влияние комбинированных гипертонических растворов на нанопроцессы в стенке кровеносных капилляров и в интерстициальном матриксе внутренних органов при ожоговой болезни / А. И. Ковальчук, Э. В. Черкасов, И. В. Дзевульская [и др.] // Украинский научно-медицинский молодежный журнал. – 2014. – № 2 (81). – С. 5–10.
2. Вплив ендогенної інтоксикації на структурні зміни органів нейроімуноендокринної системи за умов лікування опікової хвороби комбінованими гіперосмолярними розчинами / О. І. Ковальчук, Е. В. Черкасов, І. В. Дзевульська, І. В. Гунас // Український научно-медицинский молодежный журнал. – 2014. – № 1 (79). – С. 42–47.
3. Опікова травма та її наслідки / Г. П. Козинець, С. В. Слесаренко, О. М. Сорокіна [та ін.] // Дніпропетровськ: Преса України, 2008. – 224 с.
4. Порівняльна характеристика гістологічних змін в легенях щурів при дії інфузійних розчинів лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% / О. О. Яковлева, А. О. Очеретнюк, А. П. Король, О. В. Паламарчук // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2012. – № 18. – С. 120–125.
5. Порівняльна характеристика клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин печінки на фоні опікової хвороби у щурів в залежності від фармакотерапії колоїдно-гіперосмолярними розчинами / А. І. Семененко, І. Л. Черешнюк, Д. А. Лисенко, І. В. Гунас // Вісник морфології. – Вінниця. – 2011. – Т. 17, № 3. – С. 656–660.
6. Хайдуков С. В. Применение проточной цитометрии для исследования функциональных особенностей клеток иммунной системы / С. В. Хайдуков // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, № 2. – С. 199–204.
7. Burn-induced thymic apoptosis corresponds with altered TGF-beta (1) and Smad 2/3 / K. G. Hobson, K. Cho, L. K. Adamson [et al.] // J. Surg. Res. – 2002. – Vol. 105 (1). – P. 4–9.
8. Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury / K. Fukuzuka, C. K. Edwards 3rd M. Clare-Salzer [et al.] // J. Trauma. – 2000. – Vol. 49 (4). – P. 710–716.
9. Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury / K. Fukuzuka, C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzer [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2000. – Vol. 278 (4). – P. 1005–1018.
10. Gravante G. «Systemic apoptotic response» after thermal burns / G. Gravante, D. Delogu, G. Sconocchia // Apoptosis. – 2007. – Vol. 12. – P. 259–270.
11. Orrenius S. Cell Death mechanisms and their implications in toxicology / S. Orrenius, P. Nicotera // Toxicol. Sci. – 2010. – Vol. 16. – P. 1131–1137.
12. Pathophysiology of burns / M. Keck, D. Herdon, L.-P. Komolz [et al.] // Wien Med. Wochenschr. – 2009. – Vol. 159. – P. 327–336.

КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ В ТИМУСЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ В КРЫС В УСЛОВИЯХ ЕЕ ЛЕЧЕНИЯ ИНФУЗИЕЙ КОМБИНИРОВАННЫХ ГИПЕРОСМОЛЯРНЫХ РАСТВОРОВ

Черкасов В.Г.

Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Резюме. В статье представлены результаты исследования клеточной смерти показателей кинетики клеточного цикла клеток тимуса крыс с ожоговой болезнью после термического ожогового повреждения кожи на фоне применения 0,9% раствора NaCl, препаратов лактопротеина с сорбитолом или HAES-LX5%. Ожоговое повреждение кожи на фоне применения 0,9% раствора NaCl приводит к нарушениям клеточного цикла клеток тимуса, максимально выраженного через 1 и 3 сутки наблюдения. Применение препаратов лактопротеина с сорбитолом или HAES-LX-5% позволяет существенно улучшить показатели клеточного цикла клеток тимуса и уменьшить негативное влияние ожогового повреждения: лактопротеина с сорбитолом за счет влияния на синтез ДНК (фазу), а препарата HAES-LX-5% на апоптоз, что проявляется уменьшением фрагментации ДНК (SUB-G0G1).

Ключевые слова: тимус, клеточная смерть, клеточный цикл, ожоговая болезнь, ДНК-цитометрия, лактопротеин с сорбитолом, HAES-LX-5%.

CELL DEATH AND CELL CYCLE IN THYMUS DURING EXPERIMENTAL BURN DISEASE IN RAT UNDER THE CONDITION OF ITS TREATMENT BY THE INFUSION OF COMBINED HYPEROSMOLAR SOLUTIONS

Cherkasov E.V.

Bogomolets National Medical University, Kiev, Ukraine

Summary. In the article presents the results of study the cell death and of the kinetics of cell cycle indicators thymus cells of rats during burn disease after thermal burn injury of the skin on the background of treatment with 0,9% solution of NaCl, drugs lactoprotein with sorbitol or HAES-LX 5%. Burn injury of the skin on the background of treatment with 0,9% solution of NaCl leads to disruption of the cell cycle of the thymus cells is most high expressed at 1 and 3 day observation. The use lactoprotein with sorbitol or HAES-LX-5% can significantly improve the performance of the cell cycle of the thymus cell and reduce the negative impact of burn injury: lactoprotein with sorbitol affects on DNA synthesis (s-phase), and the drug HAES-LX-5% affects on apoptosis that manifests a decrease in DNA fragmentation (SUB-G0G1).

Key words: thymus, cell death, cell cycle, burn disease, DNA cytometry, Lactoprotein with Sorbitol, HAES-LX-5%.