

УДК 616–001.3/6–06:616.155.32–091.8]–092.9

ВПЛИВ ПОЛІТРАВМИ НА ДИНАМІКУ ПІЗНЬОГО АПОПТОЗУ ТКАНИННИХ ЛІМФОЦИТІВ

Д. В. Козак, А. А. Гудима

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

THE IMPACT OF POLYTRAUMA ON DYNAMICS OF LATE APOPTOSIS IN THE TISSUE LYMPHOCYTES

D. V. Kozak, A. A. Gudyta

РЕФЕРАТ

В експерименті вивчені зміни інтенсивності пізнього апоптозу лімфоцитів, виділених з різних органів, під впливом політравми. У тварин контрольної групи істотно більшою виявилася інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів легень, у порівнянні з такою серця та печінки. В динаміці політравми для пізнього апоптозу лімфоцитів легень, серця та печінки характерні незначні зміни інтенсивності впродовж 2 год – 3 дів посттравматичного періоду з суттєвим збільшенням через 7 дів, зменшенням – на 14–21–шу добу і повторним збільшенням – на 28–му добу. Це найбільш характерне для лімфоцитів легень, значно менше – серця, ще менше – печінки.

Ключові слова: політравма; пізній апоптоз; лімфоцити; легені; серце; печінка; експеримент.

SUMMARY

The changes in the late apoptosis intensity in lymphocytes, obtained from various organs under polytrauma impact, were studied in experiment. In laboratory animals of a control group the late apoptosis intensity appeared essentially bigger in pulmonary lymphocytes, comparing with those from the heart and the liver. Nonsignificant changes of intensity prolong 2 h – 3 days with essential increase in 7 days, decrease – on the 14–21th days and repeated increase – on the 28th day were characteristic in the polytrauma dynamics for late apoptosis in the lymphocytes, obtained from the lungs, the heart and the liver. It is more characteristic for pulmonary lymphocytes, significantly less – for those from the heart and even lesser – from the liver.

Key words: polytrauma; late apoptosis; lymphocytes; lungs; heart; liver; experiment.

У патогенезі травматичної хвороби важливе місце посідає апоптоз клітин, тканин і органів, який зумовлює поліорганну дисфункцію і недостатність [1], зменшення інтенсивності запальної реакції та виникнення імуносупресії у посттравматичному періоді [2]. У наших попередніх дослідженнях встановлено, що в умовах політравми значно збільшується інтенсивність раннього апоптозу тканинних лімфоцитів печінки, серця і легень впродовж 28 дів посттравматичного періоду, яка збільшується через 7 дів після політравми, зменшується – через 14 дів і в подальшому менш виражено збільшується через 21 добу [3]. Проте, ранній апоптоз відображає тільки сигнальний проапоптотичний вплив прозапальних цитокінів, його визначають за допомогою тесту з анексином. За цим тестом виявляють ранню стадію апоптозу, коли виникають зміни тільки у плазматичній мембрані клітини, а саме, мембранний фосфоліпід фосфатидилсерин переміщується з внутрішньої поверхні плазматичної мембрани на її зовнішню поверхню з збереженням цілісності клітинної мембрани. Пізні стадії апоптозу, для яких характерне порушення цілісності клітинної мембрани, оцінюють за допомогою вітальних барвників (пропідію йодиду) [4]. Саме пізній апоптоз відображає глибину втрати функцій органів і систем, що має важливе діагностичне значення.

Мета роботи: вивчити інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів, отриманих з тканини легень, серця і печінки, в динаміці політравми.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проведені на 109 нелінійних білих щурах–самцях, яких утримували на стандартному раціоні віварію. У контрольну групу включені 20 тварин, у дослідних групах було по 8–14 особин.

Політравму моделювали за методикою Д. В. Козак [5] в умовах наркозу тіопентал–натрієм (40 мг/кг маси тіла тварини). Тварин, що залишились живими, виводили з експерименту на 2–гу годину, через 1, 3, 7,

Динаміка інтенсивності пізнього апоптозу тканинних лімфоцитів легень, серця і печінки у відповідь на політравму

Пізній апоптоз лімфоцитів	Величина показника, % ($\bar{x} \pm m$) у строки спостереження							Контроль
	2 год (n=6)	1 доба (n=8)	3 доби (n=5)	7 діб (n=6)	14 діб (n=6)	21 доба (n=6)	28 діб (n=5)	
Легень	0,78±0,09	0,68±0,13	0,77±0,24	10,93±1,64***	0,79±0,06	0,80±0,04	5,99±1,30***	0,91±0,09
Серця	1,11±0,13***	1,35±0,04***	1,65±0,27***	6,38±0,64***	0,72±0,07***	1,05±0,21***	2,90±0,20***	0,52±0,05
Печінки	1,99±0,13***	0,64±0,05***	2,86±0,40***	14,90±2,48***	0,49±0,10***	0,55±0,06***	1,36±0,08***	0,37±0,03

Примітка. Різниця показників достовірна у порівнянні з такими у контрольній групі (* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$).

14, 21 і 28 діб методом тотального кровопускання з серця в умовах наркозу. Для виділення лімфоцитів з органів промиті у фосфатно-сольовому буфері легень, серце та печінку гомогенізували в подрібнювачі тканин, гомогенат центрифугували протягом 20 хв зі швидкістю 8000 об./хв. З надосадової рідини виділяли фракції лімфоцитів на градієнті щільності фікол-тріумбасту 1,077. Для оцінки реалізації пізнього апоптозу лімфоцитів легень, серця та печінки використовували пропідію йодид з набору реагентів "Annexin V Fitc" ("Beckman Coulter", Франція). Аналіз проб проводили на проточному цитометрі Epics XL ("Beckman Coulter", Франція).

Для оцінки достовірності відмінностей використовували t-критерій Ст'юдента та критерій Вілкоксона – Манна – Уїтні [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи істотно більшою була інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів легень у порівнянні з такою серця та печінки – відповідно на 42,9 і 59,3% (див. таблицю, рис. 1–3). Найнижчою була інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів печінки ($P < 0,001$).

Після моделювання політравми через 2 год, 1 і 3 доби посттравматичного періоду інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів легень достовірно не

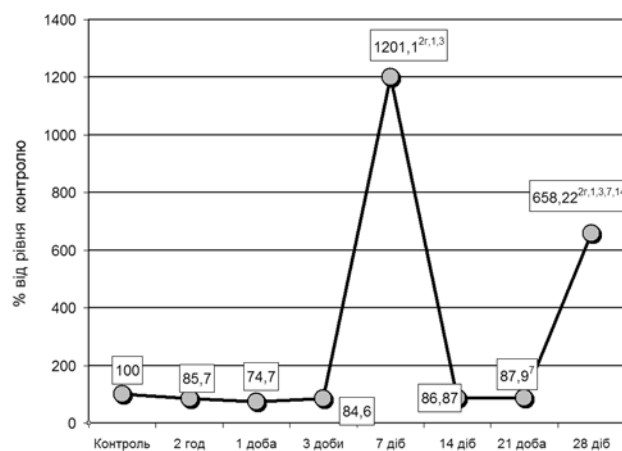


Рис. 1. Інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів легень у динаміці політравми. Тут і на рис. 2, 3 – достовірність відмінностей у порівнянні з показником відповідно через 2 год, 1, 3, 7, 14 і 21 добу після політравми ($P < 0,05$).

відрізнялася від аналогічної у контрольній групі, через 7 діб вона значно збільшилася й суттєво перевищувала таку у контрольній групі та в усі попередні строки спостереження.

На 14–ту і 21–шу добу величина досліджуваного показника істотно не відрізнялася від аналогічної у контролі, проте, на 28–му добу – знову збільшувалася. У ці строки спостереження інтенсивність пізнього

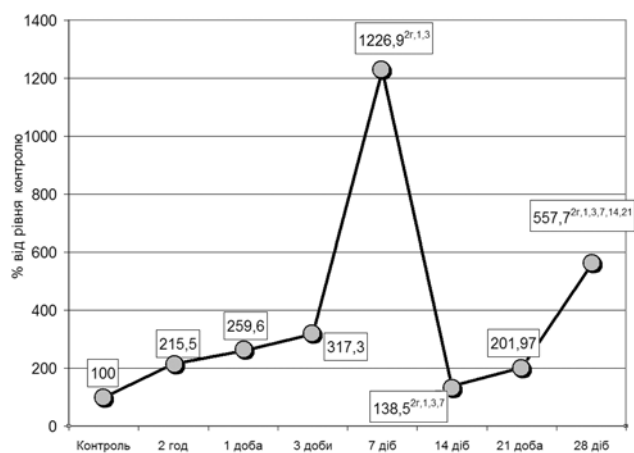


Рис. 2. Інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів серця у динаміці політравми.

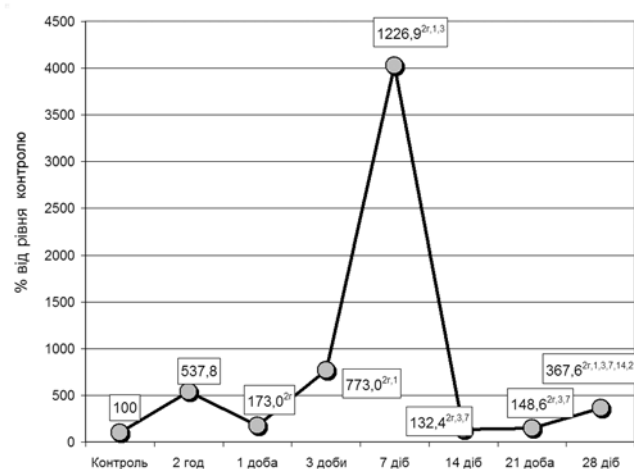


Рис. 3. Інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів печінки у динаміці політравми.

апоптозу лімфоцитів легень істотно перевищувала таку у контрольній групі, аналогічні результати відзначали через 2 год, 1, 3, 14 і 21 добу спостереження ($P < 0,05$), проте, була меншою, ніж на 28-му добу в 1,82 разу ($P < 0,05$).

Інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів серця у дослідних групах в усі строки посттравматичного періоду суттєво перевищувала таку у контрольній групі. Через 2 год, 1 і 3 доби вона поступово збільшувалася, проте, різниця недостовірна ($P > 0,05$). На 7-му добу відзначали суттєве збільшення інтенсивності пізнього апоптозу лімфоцитів серця — у 12,3 разу, ніж у контролі ($P < 0,001$), вона істотно перевищувала аналогічну величину у попередні строки спостереження ($P < 0,05$). На 14-ту добу величина показника значно зменшилася і лише на 38,5% перевищувала таку у контролі ($P < 0,001$) та виявилася істотно меншою у порівнянні з такою у попередні строки спостереження ($P < 0,05$). У подальшому, на 21-шу і 28-му добу показник знову збільшувався, досягаючи наприкінці експерименту рівня, який у 5,57 разу перевищував такий у контролі ($P < 0,001$) та у попередні строки спостереження ($P < 0,05$), проте, був суттєво меншим, ніж на 7-му добу — на 54,5% ($P < 0,05$).

Інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів печінки на тлі травми збільшилася і достовірно перевищувала таку у контролі ($P < 0,001$). Через 2 год, 1–7 діб її величина змінювалася нерівномірно, збільшувалася — через 2 год, зменшувалася — через 1 добу, збільшувалася — через 3 доби, досягала максимуму — через 7 діб ($P < 0,05$). В подальшому досліджуваний показник істотно зменшувався, досягаючи лише 132,4% у порівнянні з таким у контролі ($P < 0,001$) з подальшим поступовим збільшенням до 28-ї доби посттравматичного періоду ($P < 0,05$) у строки 2 год, 1, 3, 14 і 21 добу, що виявилось істотно меншим, ніж через 7 діб (на 52,4%, $P < 0,05$).

Таким чином, в динаміці політравми для пізнього апоптозу лімфоцитів легень, серця і печінки характерні незначні відхилення інтенсивності впродовж 2 год — 3 діб посттравматичного періоду, з значним збільшенням її через 7 діб та зменшенням через 14–21 добу і повторним збільшенням — на 28-му добу. Це найбільш характерне для лімфоцитів легень, значно менше — серця, ще менше — печінки. Порівнюючи отримані результати з даними про ранній апоптоз [3], можна стверджувати, що активація обох процесів на тлі політравми відбувається паралельно. Аналогічні результати одержані і щодо макрофагів печінки на тлі механічної травми різної тяжкості [7].

Отже, сукупність патогенетичних механізмів політравми створює передумови для реалізації як

раннього, так і пізнього — необоротного апоптозу тканинних лімфоцитів. Можна припустити, що саме пізній апоптоз лежить в основі формування органічної дисфункції і недостатності, спричиняє вторинний імунodefіцит. Більша чутливість до проапоптотичних впливів лімфоцитів легень, очевидно, є одним з захисних механізмів, який перешкоджає реалізації імунної відповіді, з виділенням чергового пулу прозапальних цитокінів у тканині легень, що супроводжується їх набряком і втратою функції.

ВИСНОВКИ

1. У тварин контрольної групи істотно більшою виявилася інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів легень у порівнянні з такою серця та печінки — відповідно на 42,9 і 59,3% ($P < 0,001$). Найнижчою була інтенсивність пізнього апоптозу лімфоцитів печінки ($P < 0,001$).

2. В динаміці політравми для пізнього апоптозу лімфоцитів легень, серця і печінки характерні незначні відхилення інтенсивності впродовж 2 год — 3 діб посттравматичного періоду з значним збільшенням її через 7 діб та зменшенням — на 14–21-шу добу і повторним збільшенням — на 28-му добу. Це найбільш характерне для лімфоцитів легень, істотно менше — серця, ще менше — печінки.

В перспективі важливим є дослідження інтенсивності пізнього апоптозу паренхіматозних клітин на тлі політравми.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дзюба Д. А. Показатели активации апоптоза в течении политравмы тяжелой степени / Д. А. Дзюба, И. Р. Малыш, Л. В. Згржебловская // Укр. журн. екстремал. медицини ім. Г. О. Можаєва. — 2008. — Т. 9, № 1. — С. 53 — 58.
2. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity / C. S. Chang, G. Y. Song, J. Lomas [et al.] // J. Leukoc. Biol. — 2003. — Vol. 74, N 3. — P. 344 — 351.
3. Козак Д. В. Вплив політравми на динаміку раннього апоптозу тканинних лімфоцитів / Д. В. Козак, А. А. Гудима // Мед. хімія. — 2012. — Т. 14, № 3(52). — С. 86 — 88.
4. Annexin V—affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphate — idylserine exposure / M. Van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers [et al.] // Cytometry. — 1998. — Vol. 31. — P. 1 — 9.
5. Пат. 63997 Україна, МПК G 09 В 23/28. Спосіб моделювання політравми / Д. В. Козак; заявник і патентовласник Терноп. держ. мед. ун—т ім. І. Я. Горбачевського. — № у 201104110; заявл. 05.04.11; опубл. 25.10.11. Бюл. № 20.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. школа, 1990. — 352 с.
7. Волотовська Н. В. Особливості апоптозу печінкових макрофагів під впливом механічної травми різного ступеня тяжкості у білих щурів / Н. В. Волотовська, А. А. Гудима // Клін.—експерим. патологія. — 2012. — Т. 11, № 3(41), ч. 1. — С. 24 — 26.

