

© І.В. Гунас, І.В. Дзевульська, Е.В. Черкасов, О.І. Ковальчук, 2015

УДК 611.814.3:611-018]:616-001.17-092.4-08

І.В. ГУНАС<sup>1</sup>, І.В. ДЗЕВУЛЬСЬКА<sup>2</sup>, Е.В. ЧЕРКАСОВ<sup>2</sup>, О.І. КОВАЛЬЧУК<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, Науково-дослідний центр, Вінниця; <sup>2</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра анатомії людини, Київ

### ВИКОРИСТАННЯ МЕМБРАНОПЛАСТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОПРОТЕЇНУ-С ДЛЯ ПОНОВЛЕННЯ СТРУКТУР ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ПРИ ОПІКОВІЙ ХВОРОБІ

В статті представлені дані щодо формування мембраноподібних структур в аденогіпофізі, кірковій речовині надниркової залози і тимусі при експериментальній опіковій хворобі у щурів за умов її лікування шляхом внутрішньовенної інфузії лактопротеїну-С.

**Ключові слова:** опік, аденогіпофіз, кіркова речовина надниркової залози, тимус, мікроскопія

**Вступ.** Глибокі опіки характеризуються не лише пошкодженням покривних тканин, а й викликають різноманітні, тривалі загальні морфологічні й функціональні зміни всіх органів і систем організму [5], які супроводжуються синдромом ендогенної інтоксикації [1, 6]. Тому, обов'язковою складовою комплексного лікування опікової хвороби клініцисти вважають внутрішньовенну інфузію препаратів дезінтоксикаційної, реологічної, енергетичної та протишокової дії, серед яких лактопротеїн з сорбітолом (лактопротеїн-С), за нашими попередніми даними, виявив мембранопластичну дію на структури гістогематичних бар'єрів [3, 4].

**Мета дослідження.** Вивчити мембранопластичний ефект дії лактопротеїну-С на структурні зміни аденогіпофіза, кіркової речовини надниркової залози і тимуса при експериментальній опіковій хворобі у щурів.

**Матеріали та методи.** Експериментальне дослідження морфологічних змін в аденогіпофізі, кірковій речовині надниркової залози та тимусі при опіковій хворобі (через 1, 3, 7, 14, 21, 30 діб) та за умов дії інфузійних колоїдно-гіперосмолярних препаратів дезінтоксикаційної, реологічної, енергетичної, протишокової дії НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом [4, 8] було виконано на 90 щурах-самцях лінії Вістар масою 155–160 грамів.

Утримання та маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), також керувалися рекомендаціями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) і положеннями «Правил до клінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)».

Тварини були розділені на 7 груп: I – інтактні тварини; II, III, IV – щури без термічної травми, яким проводилась окрема інфузія 0,9%

розчину NaCl, НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом (лактопротеїну-С) відповідно у дозі 10 мл/кг; V, VI, VII – тварини з опіком, яким за аналогічною схемою та у такому ж дозовому режимі проводили окреме введення досліджуваних речовин.

Опік (після відповідної премедикації) викликали шляхом прикладання до бічних поверхонь тулуба тварин чотирьох мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом шести хвилин у воді з постійною температурою 100° С. Загальна площа опіку в щурів зазначеної маси складала 21–23% при експозиції 10 сек., що є достатнім для формування опіку II ступеня – поверхневого опіку шкіри (колишній III А ступінь) та розвитку шокowego стану середнього ступеня важкості.

Досліджувані розчини вводили внутрішньовенно протягом 5–6 хв. у дозі 10 мл/кг маси тіла. Інфузію проводили у нижню порожнисту вену, для чого виконували її катетеризацію в асептичних умовах через стегнову вену. Катетер, встановлений у стегновій вені, підшивали під шкіру. Його просвіт по всій довжині заповнювали титрованим розчином гепарину (0,1 мл гепарину на 10 мл 0,9% розчину NaCl) після кожного введення речовин. Перше введення розчинів здійснювали через 1 годину після моделювання патологічного стану, наступні інфузії виконували щоденно упродовж 7 діб.

Проведені нами попередні дослідження показали (табл. 1), що щури-самці без будь-якої фармакокорекції на фоні опікової травми шкіри гинули всі через 9 діб експерименту, а через 7 діб летальність складала 80%, внаслідок чого (враховуючи питання біоетики) практично не можливо було набрати коректну, у кількісному відношенні, групу контролю з чистим опіком шкіри без лікування. Тому задля контролю лікувальної дії гіперосмолярних розчинів ми спиралися на групу тварин, які на фоні опіку шкіри отримували 0,9 % розчин NaCl (ізотонічний розчин).

Летальність щурів після опікової травми шкіри без введення будь-яких фармакологічних розчинів

Кількість щурів	Термін спостереження (доба)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n=10	n=3	n=1	n=2	n=0	n=1	n=0	n=1	n=0	n=2

У групі тварин з опіковою травмою шкіри, яким вводили 0,9 % розчин NaCl, виявлене (табл. 2) прогресуюче збільшення показника летальності від 5% через 1 добу до 11% у проміжку від 4-ої до 7-ї доби з наступним поступовим зменшенням величини даного показника до 3% у проміжку від 22-ої до 30-ої доби після опіку шкіри. Загальний по-

казник летальності в групі щурів-самців, яким після опіку шкіри вводили 0,9% розчин NaCl, склав 43,5%. Окрема лікувальна курсова терапія щурів з опіковою травмою шкіри розчином HAES-LX-5% подібно до такої лактопротеїном-С суттєво перешкоджала загибелі тварин упродовж усього спостереження.

Таблиця 2

Вплив фармакотерапії 0,9% розчином NaCl, лактопротеїном-С та HAES-LX-5% на показники летальності щурів з опіковою травмою шкіри

Умови досліджу	Летальність тварин (n – %)					
	Термін спостереження (доба)					
	1	2–3	4–7	8–14	15–21	22–30
Опік + 0,9 % розчин NaCl (n=200)	n=10 (5 %)	n=21 (10,5 %)	n=22 (11 %)	n=17 (8,5 %)*	n=11 (5,5 %)	n=6 (3 %)
Опік + HAES-LX-5 % (n=120)	n=2 (1,7 %)	n=4 (3,3 %)*	n=5 (4,2 %)*	n=4 (3,3 %)#	n=2 (1,7 %)	n=1 (0,8 %)
Опік + лактопротеїном-С (n=120)	n=1 (0,8 %)*	n=4 (3,3 %)*	n=3 (2,5 %)*	n=3 (2,5 %)*	n=1 (0,8 %)*	n=3 (1,7 %)

Примітки:

- \* – вірогідна різниця відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl);
- # – тенденція різниці відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl).

Ступінь інтоксикації при опіковій хворобі визначали за рівнем молекул середньої маси [2] та ЛПІ, який розраховується за формулою Я. Кальфа-Каліфа:

$$\text{ЛПІ} = ((4M + 3Ю + 2П + С) \times (\text{Пл} + 1)) / ((L + Mo) \times (E + 1)),$$

де М – мієлоцити, Ю – юні, П – паличкоядерні, С – сегментоядерні нейтрофіли, Пл – плазмоцити, Л – лімфоцити, Мо – моноцити, Е – еозинофіли.

Дослідження ступеня інтоксикації проводили в проблемній науково-дослідній лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку науково-дослідного центру Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, сертифікованої ДФЦ МОЗ України (посвідчення № 003/10 від 11.01.2010 р).

Статистичний аналіз результатів дослідження провели в пакеті STATISTICA 5.5 (належить ЦНІТ ВНМУ імені М.І. Пирогова. Ліцензійний № АХХР910А374605FA) з використанням непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним з отриманих варіаційних рядів, середні значення – за кожною ознакою, що вивчалися, та стандартні відхилення. Вірогідність різниці значень

між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерію Мана-Уїтні.

Забір матеріалу проводився під наркозом. У тварин після декапітації робили розтин порожнини черепа, черевної та грудної порожнини і вирізали за допомогою леза невеликі шматочки аденогіпофіза, кіркової речовини надниркової залози, тимуса. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою.

Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі LKB, вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим та метиленовим синім. Гістологічні зрізи (одержані з парафінових блоків) забарвлювали гематоксилін-пікрофуксином та гематоксилін-еозином. Морфометричне дослідження гістологічних препаратів було проведене із використанням мікроскопу Olympus BX51. Отримані результати статистично обробляли з використанням t-критерію Стьюдента.

Електронномікроскопічне дослідження виконано на базі відділу електронної мікроскопії (науковий керівник – професор Л.О. Стеченко) Інституту проблем патології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Динаміка показників ступеня інтоксикації свідчить, що рівень молекул середньої маси та лейкоцитарного індексу інтоксикації (ЛІІ) статистично значуще нижчий у щурів без опіку, ніж у щурів з опіком упродовж всього експерименту. Досліджувані показники статистично значуще вищі у щурів, яким вводили 0,9% розчин NaCl порівняно з тваринами, яким проводили окрему інфузію лактопротеїну-С та НАЕС-LX-5%. Найвищі показники рівня молекул середньої маси у щурів з опіком зафіксовані через 3 доби після опіку, що відповідає періоду гострого опікового шоку. Найменший рівень молекул середньої маси у щурів з опіком встановленим через 30 діб після травми. Рівень ЛІІ досягав свого максимуму у щурів з опіком, яким вводили лактопротеїн-С та НАЕС-LX-5% через 3 доби.

Для аденогіпофіза, кіркової речовини надниркової залози і тимуса щурів з опіковою травмою шкіри, яким вводили 0,9% розчин NaCl, через 1, 3, 7 та 14 діб експерименту (терміни, коли зареєстроване збільшення та стабілізація величини показників

летальності та ендогенної інтоксикації) найбільш характерним загальним проявом патоморфологічних змін був некроз функціонально різних клітин органів. У цей період у стінці кровоносних капілярів і венул спостерігається набряк ендотеліоцитів, їх парціальний і тотальний некроз, відбувається потоншення та локальна руйнація базальної мембрани, утворюються паравазальні крововиливи. В стінці кровоносних капілярів зі збереженою судинною стінкою ендотеліальне покриття стає тонким, в ділянках простих за формою і невеликих за довжиною міждотеліальних контактів з'являються розширені міждотеліальні щілини або трансдотеліальні канали [9], які в зонах відповідних до них локусів руйнації базальної мембрани мають вигляд наскрізних трансмуральних дефектів (рис. 1). Описані трансмуральні дефекти разом із прилеглими і розширеними (у результаті розвитку набряку) міжклітинними просторами вивчених органів є місцями «протікання» і внутрішньоорганного «проникнення» плазми та клітин крові, що призводить до прогресування набряку та крововиливів.

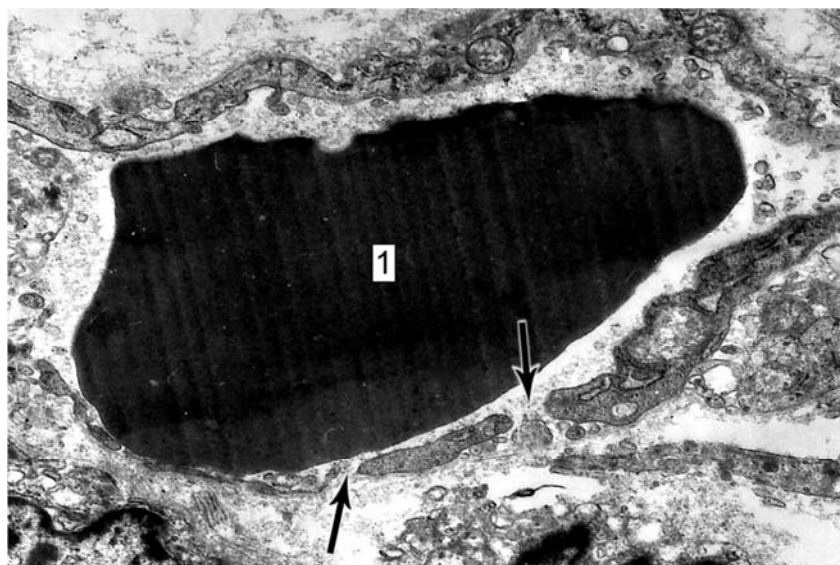


Рис. 1. Утворення наскрізних дефектів (трансдотеліальних каналів та відповідних до них локусів зникнення базальної мембрани) в стінці кровоносного капіляра тимуса щура через 7 діб розвитку опікової хвороби за умов введення 0,9% розчину NaCl. Стрілочками відзначені наскрізні дефекти кровоносного капіляра. 1 – еритроцит у просвіті кровоносного капіляра. Зб. x15000.

У щурів з опіковою травмою, яким за схемою експерименту були введені гіперосмолярні розчини (VI та VII групи тварин), у досліджених органах нейроімуноендокринної системи не виявлені суттєві пошкодження стінки кровоносних судин та крововиливи, а також, відповідно, не зареєстровані структурні ознаки паравазального та міжклітинного набряку. Це свідчить про ангіопротекторні властивості застосованих комбінованих гіперосмолярних розчинів, які за умов застосування лактопротеїну-С пов'язані з доволі специфічною мембранопластичною дією цього препарату.

Через 3 доби і, особливо, через 7 діб у досліджених органах тварин з опіковою травмою, яким

був введений лактопротеїн-С (VII експериментальна група), навколо кровоносних судин та в зоні базальної мембрани судинної стінки відзначене нерівномірне накопичення гетероморфного електроннощільного матеріалу (складається з неоднаково розподілених в аморфному матриці дрібних фібрил та гранул). Загальна електронна щільність цього матеріалу є меншою ніж щільність матриксу еритроцитів у судинному просвіті. Цей матеріал на електронограмах відрізняється від розташованого у судинному просвіті лактопротеїну-С, який візуально є гомогенним і аморфним.

Паравазальний характер розташування зазначеного електроннощільного матеріалу свідчить,

що його поява пов'язана з специфікою транспорту складових лактопротеїну-С після опікової травми через «протікання» судинної стінки, які вони чітко декорують. Складові лактопротеїну-С, що потрапили у судинну стінку та розповсюдились через

«проникнення» (рис. 2, 3) паравазально, модифікуються внаслідок фагоцитозу та синтезуючої діяльності прилеглих клітин з утворенням специфічного внутрішньоорганного мембраноподібного комплексу (рис. 4).



Рис. 2. Електроннощільне «проникнення» (відзначено стрілками) у міжклітинному інтерстиційному матриксі аденогіпофіза щура через 3 доби розвитку опікової хвороби при умові введення лактопротеїну-С. 1 – еритроцити в просвіті кровоносного капіляра. Зб. x9800.

Просторово-часові параметри формування виявлених мембраноподібних структур свідчать, що вони є проявом довготривалої адаптації [7]. Окремі описані специфічні мембраноподібні структури об'єднуються у комірці і відокремлюють кластери клітин, які заміщують решту загиблих внаслідок не-

крозу та апоптозу [10] клітин. Через 14, 21 та 30 діб експерименту специфічні мембраноподібні структури в судинній стінці та в паренхімі досліджених органів утворюють розгалужений мембраноподібний комплекс, в комірках якого локалізовані клітини, що мають типові ознаки морфологічної норми.

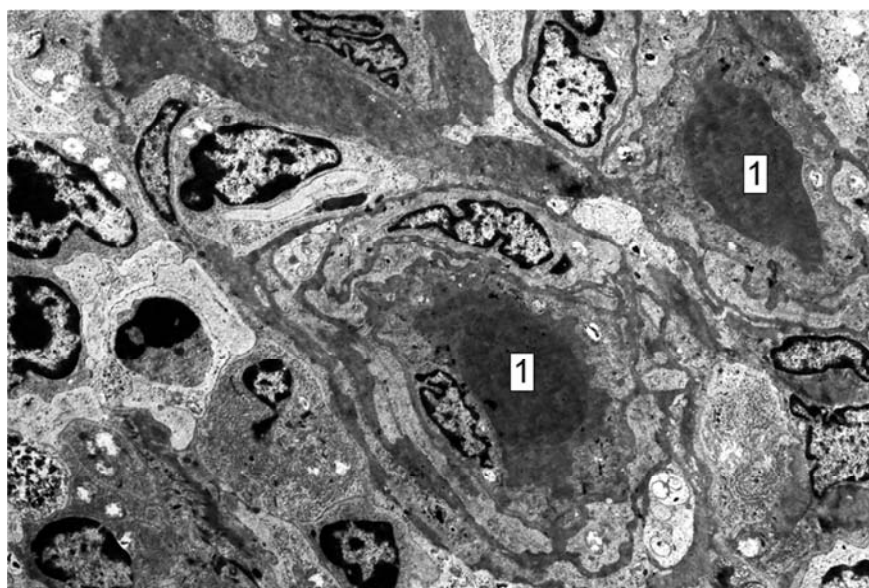


Рис. 3. Електроннощільний вміст у просвіті кровоносних капілярів (1), що «декорує» розширені міжклітинні щілини судинної стінки і ніби «розливається» навколо судин тимуса щура через 7 діб розвитку опікової хвороби за умов введення лактопротеїну-С. Зб. x6000.

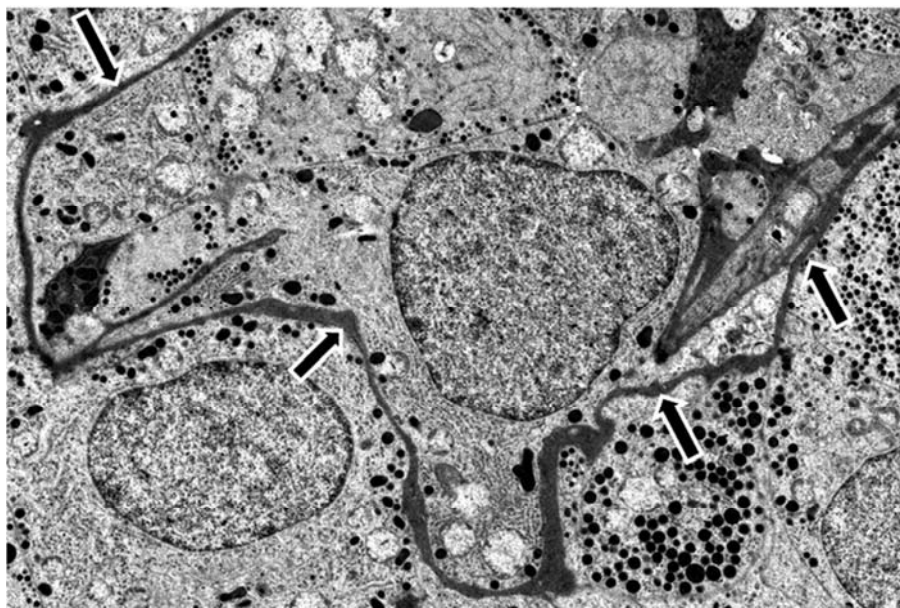


Рис. 4. Специфічний внутрішньоорганний мембраноподібний комплекс (відзначений стрілками) в аденогіпофізі щура на 14 добу розвитку опікової хвороби за умови введення лактопротеїну-С. Зб. x8600.

Лактопротеїн-С в умовах появи зон «протікання» та «проникнення» в аденогіпофізі, кірковій речовині надниркової залози і тимусі при опіковій хворобі не обмежується дезінтоксикаційною, реологічною та протишоковою діями його власне інфузійного впливу, але й проявляється виразним замінним мембранопластичним ефектом.

**Висновки.** Загальним проявом морфологічних змін в аденогіпофізі, кірковій речовині надниркової залози та тимусі при опіковій хворобі є некроз і апоптоз функціонально різних клітин органів та стінок судин гемомікроциркуляторного русла на тлі утворення крововиливів, виразного паравазального та міжклітинного набряку. Повідним фактором розвитку набряку в досліджених органах при опіковій хворобі є широкий діапазон морфофункціональних змін судинного ендотелію, які призводять до утворення наскрізних трансмуральних дефектів у стінці кровоносних судин («проті-

кань») і відповідних внутрішньоорганних міжклітинних розширень («проникнень»), маркером яких є електроннощільний лактопротеїн-С.

Лактопротеїн-С та НАЕС-LX-5% за умов розвитку опікової хвороби проявляють адаптогенні (цито- та ангіопротекторні) властивості, гальмують розвиток крововиливів, набряку, попереджають альтерацію клітин аденогіпофіза, кірковій речовині надниркової залози і тимуса та сприяють репарації органів. Лактопротеїн-С за умов розвитку опікової хвороби проявляє структурозамісні мембранопластичні властивості, що полягають в утворенні системи взаємозв'язаних мембраноподібних структур.

**Перспектива подальших досліджень** у даному напрямку полягає у вивченні ізольованої дії кожної складової лактопротеїну з сорбітолом на структурні механізми мембранопластичних змін у внутрішніх органах при експериментальній опіковій травмі.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Афанасьєва А.Н. Синдром эндогенной интоксикации и системного воспалительного ответа: общность и различия / А.Н. Афанасьєва, И.Н. Одинцова, В.В. Удут // Анестезиология и реанимация – 2007. — №4. — С. 67—71.
2. Гунас І.В. Динаміка змін ендогенної інтоксикації в організмі щурів протягом місяця після опіку шкіри II–III ступеня, площею 21–23 % поверхні тіла та її корекція інфузійними розчинами лактопротеїну з сорбітолом та НАЕС-LX-5% / І.В. Гунас, Б.О. Кондрацький, І.К. Нурметова [та ін.] // Український морфологічний альманах. — 2012. — Т. 10, №4. — С. 29—34.
3. Дзевульська І.В. Морфологическая характеристика гистогематических барьеров в органах нейроиммуноэндокринной системы при инфузионной терапии ожоговой болезни комбинированными гипертоническими растворами / И.В. Дзевульська, И.В. Гунас, Э.В. Черкасов [и др.] // Хирургия. Восточная Европа. — 2014. — №2 (10). — С. 113—124.
4. Ковальчук О.І. Механізми структурної трансформації гистогематичних бар'єрів органів нейроіммуноендокринної системи за умов інфузійної терапії опікової хвороби / О.І. Ковальчук, І.В. Дзевульська, Е.В. Черкасов [та ін.] // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2014. — Т. 13, № 2. — С. 69—74.
5. Козинець Г.П. Опікова хвороба та її наслідки / Г.П. Козинець, С.В. Слесаренко, О.М. Сорокіна [та ін.] // Дніпропетровськ: Преса України, 2008. — 224 с.

6. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации / Ф.З. Меерсон. – М.: Дело, 1993. — 138 с.
7. Межирова Н.М. Патологические и диагностические аспекты синдрома системного воспалительного ответа / Н.М. Межирова, В.В. Данилова, С.С. Овчаренко // Медицина неотложных состояний. — 2011. — №1–2. — С. 32–39.
8. Ушакова Т.А. Роль изучения процесса адаптации на ожоговую травму / Т.А. Ушакова // Комбустиология. — 2004. — № 18–19. — С. 29–7.
9. Aird W.C. Spatial and temporal dynamics of the endothelium / W.C. Aird // Thromb. Hemost. — 2005. — Vol. 3, № 7. — P. 1392–1406.
10. Kroemer G. Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele [et al.] // Cell Death Differ. — 2009. — Vol. 16. — P. 1–3.
11. Keck M. Pathophysiology of burns / M. Keck, D. Yudon, L.-P. Kamolz // Wien Med. Wochenschr. — 2009. — Vol. 159. — P. 327–336.
12. Shupp G. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression / G. Shupp, T. Nasabzadeh, D. Posenthal [et al.] // J. Burn Care Res. — 2010. — Vol. 31 (6). — P. 849–873.

I.V. HUNAS<sup>1</sup>, I.V. DZEVULSKA<sup>2</sup>, E.V. CHERKASOV<sup>2</sup>, O.I. KOVALCHUK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Pirogovs Vinnitsa National Medical University, Research Center, Vinnytsa;* <sup>2</sup>*Bogomolets National Medical University, Department of Human Anatomy, Kyiv*

USE MEMBRANOPLASTYCHNYH PROPERTIES LACTOPROTEINUM-C TO RECOVER THE STRUCTURE OF INTERNAL ORGANS DURING BURN DISEASE

The article presents data in relation to structural changes in adenohipophysis, cortex of adrenal gland and thymus during experimental burn disease in rat under the condition of its treatment by the intravenous infusion of colloid-hyperosmolar solutions.

**Key words:** burn disease, adenohipophysis, cortex of adrenal gland, thymus, microscopy

**Стаття надійшла до редакції: 28.11.2014**