

ПОКАЗНИКИ ЛЕТАЛЬНОСТІ ТА СТРУКТУРНІ ЗМІНИ АДЕНОГІПОФІЗА ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ОПІКОВІЙ ТРАВМІ ШКІРИ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ ВНУТРІШНЬОВЕННОЇ ІНФУЗІЇ ДЕЗІНТОКСИКАЦІЙНИХ РОЗЧИНІВ

Ковальчук О.І.

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

Ключові слова: опікова травма, аденогіпофіз, автофагія, світлова та електронна мікроскопія.

Вступ

Пошкодження шкіри, слизових оболонок, часто з підлеглими тканинами, внаслідок дії високої температури (термічний опік), хімічних агресивних речовин (хімічний), електричного струму (електричний), радіації (променевий) та інших чинників будь-якої локалізації перебігає відповідно до загальних закономірностей ураження тканин [1]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я опіки за частотою займають третє місце серед інших травм, а в деяких країнах – друге, поступаючись лише транспортним травмам. Проблема термічних уражень визначається порівняно високою частотою їх у побуті і на виробництві, тяжкістю опікової травми, складністю і тривалістю лікування таких хворих, частою інвалідизацією та високою летальністю. Актуальність даного дослідження обумовлена тим, що до цього часу структурні зміни аденогіпофіза при опіковій травмі за умов її лікування шляхом інфузії дезінтоксикаційними розчинами не були предметом спеціальних досліджень [1].

Метою роботи було вивчення структурних змін аденогіпофіза та показників летальності щурів при експериментальній опіковій травмі за умов її лікування шляхом внутрішньовенної інфузії різними дезінтоксикаційними розчинами.

Матеріали та методи.

Експериментальне дослідження морфологічних змін в аденогіпофізі при опіковій травмі (через 1, 3, 7, 14, 21, 30 діб) за умов інфузії 0,9% розчину NaCl, а також колоїдно-гіперосмолярних препаратів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом (фірмова назва препарату – “Лактопротеїн-С”) було виконано на 90 щурах-самцях лінії Вістар масою 155-160 грам.

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, HAES-LX-5% та 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 упродовж 6 хвилин у воді з постійною температурою 100 °С. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складала 21–23% при експозиції 10 сек., що є достатнім для формування опіку II ступеня – дермального поверхневого опіку (колишній III А ступінь) та розвитку шокового стану середнього ступеня важкості.

Досліджувані розчини вводили внутрішньовенно упродовж 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 загалом впродовж 7 діб.

Забір матеріалу проводився під наркозом. У тварин після декапітації робили розтин грудної порожнини і вирізали за допомогою леза невеликі шматочки тимуса. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою.

Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі “LKB”, і вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім, вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX 51.

Експеримент був здійснений на базі Науково-дослідного центру (директор – професор І.В. Гунас) Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пир-

рогова. 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 та обговорення. Проведені нами попередні дослідження показали (табл. 1), що щури-самці без будь-якої фармакологічної корекції на фоні опікової травми шкіри гинули всі на 9-у добу експерименту, а на 7-у добу летальність складала 80%, в зв'язку з чим (враховуючи питання біоетики), практично неможливим було набрати коректну, у кількісному відношенні, групу контролю з чистим опіком шкіри без лікування. З метою контролю лікувальної дії колоїдно-гіперосмолярних розчинів ми спиралися на групу тварин, які на фоні опіку шкіри отримували 0,9% розчин NaCl.

Таблиця 1.

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 прогресуюче збільшення показника летальності від 5% через 1-у добу до 11% у проміжку від 4-ї до 7-ї доби з наступним поступовим зменшенням величини даного показника до 3% у проміжку від 22-ї до 30-ї доби після опіку шкіри. Загальний показник летальності в групі щурів самців, яким після опіку шкіри вводили 0,9% розчин NaCl склав 43,5%. Окрема лікуваль-

гальмуються інфузією розчинів HAES-LX-5% та лактопротеїну-С.

Нами встановлено, що частина клітин аденогіпофіза на етапах розвитку опікової травми гине шляхом апоптозу та некрозу. З'ясовано також, що введення HAES-LX-5% і лактопротеїну-С гальмує структурні прояви клітинної загибелі та сприяє збереженню життя клітин аденогіпофіза за рахунок залучення механізмів автофагії (Рис. 4, 5, 6).

Свідченням ініціації автофагії є оточення та секвестрація клітинних органел і локусів ущільнення дрібно-гранулярного цитоплазматичного матрикса подвійною ізолюючою мембраною (фагофором). Найбільш типовим та розповсюдженим варіантом утворення фагофорів є (Рис. 4) концентричне групування каналців гранулярної ендоплазматичної сітки навколо "ядра" (агрегованих протеїнів, ушкоджених мітохондрій та каналців ендоплазматичної сітки). Канальці ендоплазматичної сітки з'єднуються своїми кінцями і утворюють концентричні кола. В результаті утворюється замкнена автофагосома.

Як свідчать одержані нами дані, автофагосоми в клітинах аденогіпофіза підлягають послідовному процесу розвитку, що включає їх об'єднання з лізосомами та утворення автофаголізосом. Останнє забезпечує ізолюваний контакт секвестрованого цитоплазматичного вмісту з лізосомальними компонентами, їх злиття та деградацію (Рис. 5, 6).

Одержані дані дозволяють погодитися з розповсюдженою точкою зору [3, 4, 5, 6, 7], що автофагія допомагає здійснювати гомеостатичний контроль у клітині за рахунок акумуляції спотворених протеїнів та органел. Загалом селективна автофагія подовжує життя клітин і є запобіжником швидкої клітинної загибелі внаслідок апоптозу та некрозу.

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 + лактопротеїн-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: 1. * – достовірна різниця відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl); 2. # – тенденція різниці відносно контролю (опік + 0,9 % NaCl).

на курсова терапія щурів з опіковою травмою шкіри розчином HAES-LX-5% подібно до такої лактопротеїном-С суттєво перешкождала загибелі тварин упродовж усього спостереження.

Загальним проявом патоморфологічних змін аденогіпофіза при опіковій травмі за умов інфузії 0,9% розчину NaCl є альтерація клітин та стінок судин гемомікроциркуляторного русла, крововиливи та виразний паравазальний набряк (Рис. 1, 2, 3). Ці патологічні явища

Висновки.

1. Встановлено, що внутрішньовенна інфузія лактопротеїну-С та HAES-LX-5% запобігає розвитку крововиливів та паравазального набряку в аденогіпофізі щурів при експериментальній опіковій травмі шкіри.

2. Селективна автофагія сприяє акумуляції ділянок цитоплазми та спотворених органел і гальмує механізми клітинної загибелі в аденогіпофізі шляхом апоптозу та некрозу.

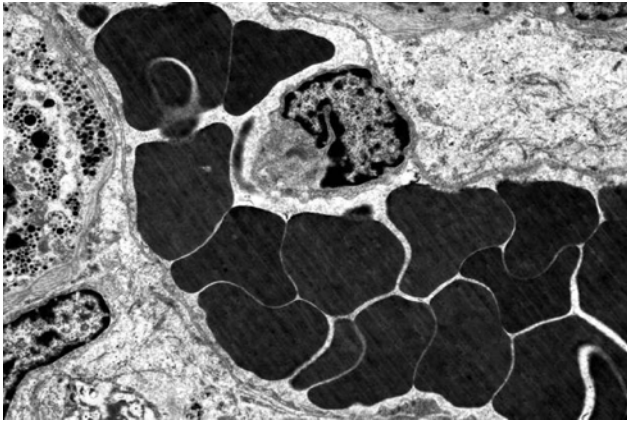


Рис. 1. Стаз еритроцитів у просвіті кровоносного капіляра аденогініфіза щура через 1 добу після експериментальної опікової травми за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Зб. 6000.

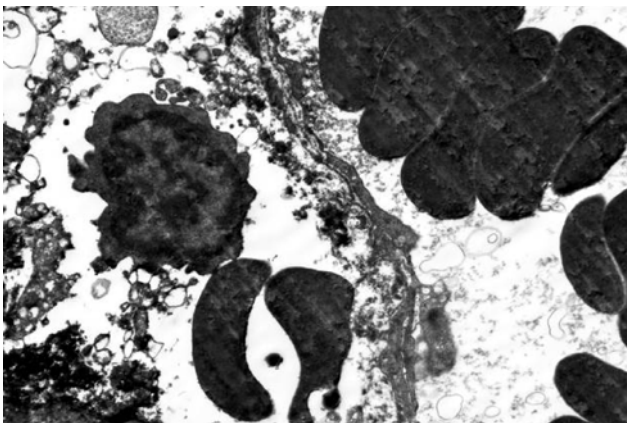


Рис. 2. Стаз еритроцитів у просвіті кровоносного капіляра, периваскулярний набряк, локальний крововилив та зона некрозу в аденогініфізі щура через 3 доби після експериментальної опікової травми за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Зб. 10000.

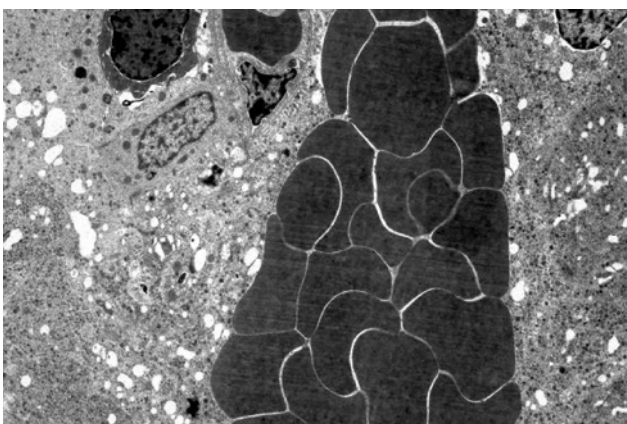


Рис. 3. Осередок крововиливу в аденогініфізі щура через 7 днів після експериментальної опікової травми за умов введення 0,9 % розчину NaCl. Зб. 6 000.

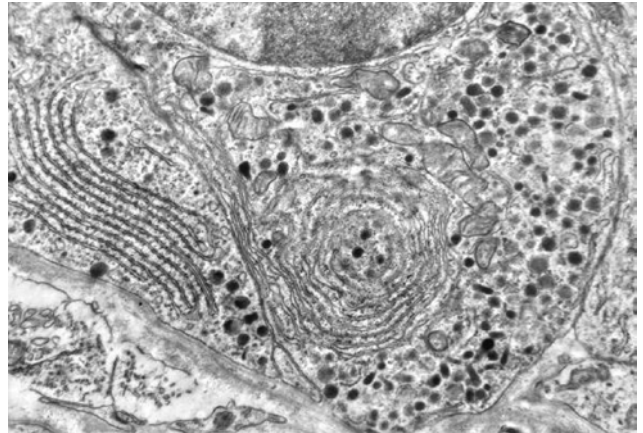


Рис. 4. Концентричне групування каналців гранулярної ендоплазматичної сітки (як початкова стадія утворення автофагосоми) в цитоплазмі кортикотропоцита аденогініфіза щура через 3 доби після експериментальної опікової травми за умов введення лактопротеїну-С. Зб. 15000.

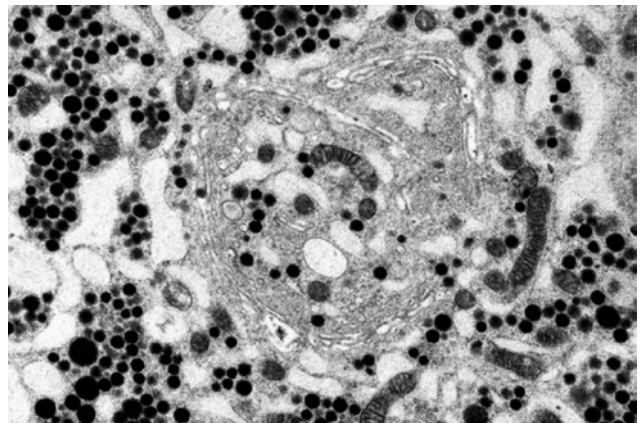


Рис. 5. Дозрівання автофагосоми в цитоплазмі соматотропоцита аденогініфіза щура через 7 днів після експериментальної опікової травми за умов введення лактопротеїну-С. Зб. 16000.

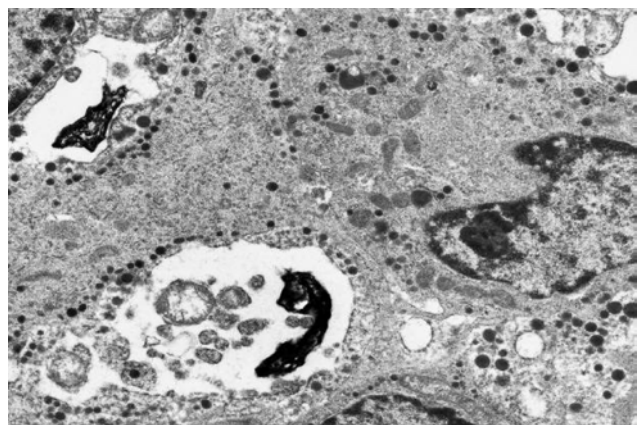


Рис. 6. Руйнація вмісту автофаголізосом в цитоплазмі кортикотропоцита аденогініфіза щура через 7 днів після експериментальної опікової травми за умов введення лактопротеїну-С. Зб. 14 000.

Перспектива подальших досліджень у даному напрямку полягає у вивченні за допомогою цитофотометрії показників клітинного циклу та апоптозу в аденогініфізі тварин при ек-

периментальній опіковій травмі шкіри за умов застосування інфузії розчинів лактопротеїну-С та HAES-LX-5%.

Рецензент: д.мед.н., професор Черкасов В.Г.

ЛІТЕРАТУРА

1. Григорьева Т.Г. Ожоговая болезнь // Междун. мед. журн. – 2000. – Т. 6, № 2 – С. 53-60.
2. Рожков І.М. Функціональна морфологія аденогіпофіза ссавців: сучасний погляд і перспективи досліджень / І.М. Рожков, В.М. Гордієнко // Миколаїв: МДУ, 2008. – 148с.
3. Hoyer-Hansen M., Gatta M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium // *Cell Death Differ.* – 2007. – Vol. 14. – P. 1576-1582.
4. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16. – P. 1-3.
5. Intercellular communication within the rat anterior pituitary: XIV electron microscopic and immunohistochemical study on the relationship between the agranular cells and GnRH neurons in the dorsal pars tuberalis of the pituitary gland / N. Shirasawa, E. Sakuma, I. Wada [et al.] // *Anat. Rec. (Hoboken).* – 2007. – Vol. 290, 11. – P. 1388-1398.
6. Scarletti F., Granata R., Meijer A. G., Codogno P. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16 – P. 12-20.
7. Van der Vaart A., Mari M., Reggiori F. Apicky eater: exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies // *Traffic.* – 2008. – Vol. 9. – P. 281- 289.

ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕТАЛЬНОСТИ И СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АДЕНОГИПОФИЗА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЕ КОЖИ ПРИ УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ВНУТРИВЕННОЙ ИНФУЗИИ ДЕЗИНТОКСИКАЦИОННЫХ РАСТВОРОВ

Ковальчук А.И.

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

Резюме: В статье приведены данные по динамике летальности и структурных изменений клеток аденогипофиза крыс при ожоговой травме и ее лечении путем внутривенной инфузии дезинтоксикационных растворов. На основании морфологического исследования установлено, что лечебная курсовая терапия крыс с ожоговой травмой кожи растворами HAES-LX-5% и лактопротеина-С существенно препятствовала гибели животных в течение всего наблюдения и нормализовала состояние клеток аденогипофиза.

Ключевые слова: ожоговая травма, аденогипофиз, автофагия, световая и электронная микроскопия.

INDEXES OF LETHALITY AND STRUCTURAL CHANGES OF RAT'S ADENOHYPHYSIS AT THE EXPERIMENTAL BURN INJURY OF SKIN ON CONDITIONS OF APPLICATION OF INTRAVENOUS INFUSION OF DESINTOXICATION SOLUTIONS

Kovalchuk A.I.

*Bogomolets National Medical University
Kiev, Ukraine*

Summary: The article presents data on dynamics of letality and structural change of adenohiphysis cells in rats with burn injuries and their treatment by intravenous infusion detoxification solutions. Based on morphological studies found that medical therapy course rats with burn injuries skin solutions HAES-LX-5% and lactoprotein-C significantly prevented the death of animals throughout the observation and normalized state of adenohiphysis cells.

Key words: burn injury, adenohiphysis, autophagy, light and electron microscopy.