

# ДИНАМІКА РІЗНИХ ТИПІВ КЛІТИННОЇ СМЕРТІ В ТИМУСІ, НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗАХ, АДЕНОГІПОФІЗИ ТА ЗМІНИ РІВНЯ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ОПІКОВІЙ ХВОРОБИ ЗА УМОВ ІНФУЗІЇ КОМБІНОВАНИХ ГІПЕРОСМОЛЯРНИХ РОЗЧИНІВ

Гунас І.В.<sup>1</sup>, Черкасов Е.В.<sup>2</sup>, Дзевульська І.В.<sup>2</sup>, Ковальчук О.І.<sup>2</sup>

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, м. Вінниця, Україна<sup>1</sup>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна<sup>2</sup>

**Ключові слова:** опікова травма, ультраструктурні модифікації клітин, клітинна смерть, молекули середньої маси, лейкоцитарний індекс інтоксикації, лактопротеїн-С, HAES-LX-5 %, ізотонічний розчин.

**Вступ.** Удосконалення методів лікування опікової хвороби за останній час практично не вплинуло на прогноз для життя при важкій термічній травмі. Велика частина постраждалих до цього часу гине від так званої ендогенної інтоксикації [1-5]. Вивчення даного питання в умовах опікової аутоінтоксикації є найбільш перспективним, так як термічні ураження супроводжуються вираженими проявами стресу і запалення, які мають явне відношення до патогенезу більшості нозологічних форм.

Найбільш перспективним для поглибленого вивчення ендогенної інтоксикації в якості субстратів є молекули середньої маси, тобто олігопептиди з масою від 500 до 5000 Д, що по своїй природі відносяться до білкових токсинів з високим вмістом дикарбонових і низьким – ароматичних кислот. Молекули середньої маси мають пряму мембранотоксичну дію та ініціюють появу пептидів, близьких за структурою до біорегуляторів. Молекулам середньої маси притаманна висока біологічна активність. Серед молекул середньої маси виділяють гепатоцеребральні, уремичні, ішемічні, опікові. Вважають, що значне підвищення вмісту молекул середньої маси у крові при різних видах патології є прогностично несприятливим показником перебігу різних захворювань [1, 4, 5].

**Мета роботи** – встановити динаміку різних типів клітинної смерті в тимусі, надниркових залозах, аденогіпофізі та зміни рівня ендогенної інтоксикації у щурів з опіком (II-III ступеня, площею 21-23 % поверхні тіла) та без опіку шкіри при введенні ізотонічного розчину, лактопротеїну з сорбітолом або HAES-LX-5 %.

**Матеріали та методи дослідження.** У рамках наукового співробітництва між ДУ “Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України” (м. Львів) і Вінницьким національним медичним університетом імені М.І. Пирогова та між Національним медичним університетом імені О.О. Богомольця і Вінницьким національним медичним університетом імені М.І. Пирогова, експериментальні дослідження терапевтичної дії інфузійних пре-

паратів: 0,9 % розчину NaCl, референс-препарату лактопротеїну з сорбітолом (лактопротеїну-С) та досліджуваного препарату HAES-LX-5 % після опікової травми шкіри та без опіку шкіри були виконані на 359 білих щурах-самцях масою 160-180 г, отриманих із віварію Інституту фармакології та токсикології НАМН України. Щури утримувались в умовах віварію Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова на стандартному водно-харчовому раціоні, при вільному доступі до води та їжі у вигляді збалансованого комбікорму за встановленими нормами. Температура в приміщенні, де утримувались тварини, підтримували на рівні 24-25 °С.

Під час експерименту дотримувались гуманного відношення до експериментальних тварин та вимог, затверджених комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету № 5 від 4 березня 2010 року; Міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами; дотримувались правил “Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою” (1984); методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України “Доклінічні дослідження лікарських засобів”.

Тварини були розподілені 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 ведення досліджуваних речовин.

Усім тваринам перед моделюванням патологічного стану, бічні поверхні тулуба брили механічною машинкою та безпечною бритвою. Опікову травму викликали шляхом прикладання 4-ох мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом 6-ти хв. у воді з постійною температурою 100 °С. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складає 21–23 % при експозиції 10 сек, що є достатнім для формування опіку

II-III ступеня та розвитку шокового стану середнього ступеня важкості [2].

Інфузію корегуючих розчинів проводили у нижню порожнисту вену після її катетеризації в асептичних умовах через стегнову вену. Катетер підшивали під шкіру, його просвіт по всій довжині заповнювали титрованим розчином гепарину (0,1мл гепарину на 10 мл 0,9% розчину NaCl) після кожного ведення речовин. Перше введення здійснювали через 1 год після моделювання патологічного стану, послідовні інфузії виконували раз на добу на протязі перших 7 діб. Бриття тварин, постановку опіків, катетеризацію магістральних судин та декапітацію тварин здійснювали в умовах пропорофолового наркозу 60 мг/кг в/в.

Ступінь інтоксикації при опіковій хворобі визначали за рівнем молекул середньої маси [7] та ЛПІ, який розраховується за формулою Я. Кальф-Каліфа:  $ЛПІ = ((4M + 3Ю + 2П + С) \times (Пл + 1)) / ((Л + Мо) \times (Е + 1))$ , 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 дисертаційного 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. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерія Мана-Уїтні.

Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за загальноприйнятою методикою. Ультраструктурні зрізи готували на ультрамікромомі "LKB" і вивчали та фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім, вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX51.

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 і обговорення.** Нами встановлено, що на етапах розвитку опікової хвороби частина клітин тимуса, надниркових за-

лоз та аденогіпофіза гине шляхом [6] апоптоза, некроза, автофагії (а в тимусі і за рахунок зроговіння, мітотичної катастрофи і апонекроза). З'ясовано також, що введення HAES-LX-5% і лактопротеїну-С гальмує структурні прояви клітинної загибелі та сприяє ефективній репродукції клітин.

Виявлено, що структурні зміни в тимусі, надниркових залозах та аденогіпофізі залежать від рівня ендогенної інтоксикації.

Результати проведеного дослідження (див. рис. 1 та рис. 2) свідчать, що рівень молекул середньої маси та лейкоцитарного індексу інтоксикації (ЛПІ) статистично значуще нижчий у шурів без опіку ніж у шурів з опіком на протязі всього експерименту. Досліджувані показники статистично значуще вищі у шурів, яким вводили ізотонічний розчин в порівнянні з тваринами, яким проводили окрему інфузію лактопротеїну-С та HAES-LX-5%. Найвищі показники рівня молекул середньої маси у шурів з опіком зафіксовані через 3 доби після опіку, відповідає періоду гострого опікового шоку. Найменший рівень молекул середньої маси у шурів з опіком встановлений через 30 діб після травми.

Рівень ЛПІ досягав свого максимуму у шурів з опіком, яким вводили лактопротеїн-С та HAES-LX-5% через 3 доби,

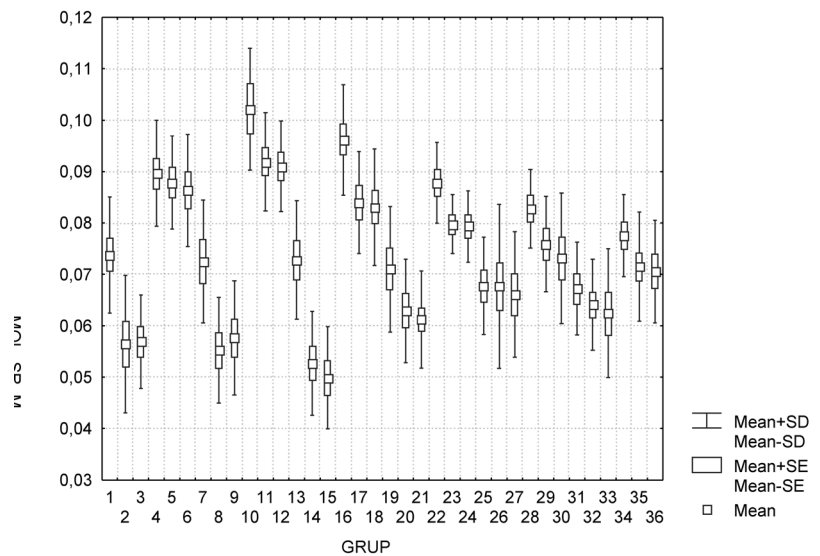


Рис. 1. Рівень молекул середньої маси протягом місяця після опіку шкіри та його корекції колоїдними гіперосмолярними розчинами.

**Позначення:** тут і в подальшому Mean – середня вибірки; Mean±SE – похибка середньої; Mean±SD – стандартне відхилення середньої; GRUP – шкала груп дослідження; MOL\_SR\_M – шкала рівня молекул середньої маси; 1 – 1 доба ізотонічний розчин; 2 – 1 доба лактопротеїн-С; 3 – 1 доба HAES-LX-5%; 4 – 1 доба опік + ізотонічний розчин; 5 – 1 доба опік + лактопротеїн-С; 6 – 1 доба опік + HAES-LX-5%; 7 – 3 доба ізотонічний розчин; 8 – 3 доба лактопротеїн-С; 9 – 3 доба HAES-LX-5%; 10 – 3 доба опік + ізотонічний розчин; 11 – 3 доба опік + лактопротеїн-С; 12 – 3 доба опік + HAES-LX-5%; 13 – 7 доба ізотонічний розчин; 14 – 7 доба лактопротеїн-С; 15 – 7 доба HAES-LX-5%; 16 – 7 доба опік + ізотонічний розчин; 17 – 7 доба опік + лактопротеїн-С; 18 – 7 доба опік + HAES-LX-5%; 19 – 14 доба ізотонічний розчин; 20 – 14 доба лактопротеїн-С; 21 – 14 доба HAES-LX-5%; 22 – 14 доба опік + ізотонічний розчин; 23 – 14 доба опік + лактопротеїн-С; 24 – 14 доба опік + HAES-LX-5%; 25 – 21 доба ізотонічний розчин; 26 – 21 доба лактопротеїн-С; 27 – 21 доба HAES-LX-5%; 28 – 21 доба опік + ізотонічний розчин; 29 – 21 доба опік + лактопротеїн-С; 30 – 21 доба опік + HAES-LX-5%; 31 – 30 доба ізотонічний розчин; 32 – 30 доба лактопротеїн-С; 33 – 30 доба HAES-LX-5%; 34 – 30 доба опік + ізотонічний розчин; 35 – 30 доба опік + лактопротеїн-С; 36 – 30 доба опік + HAES-LX-5%.

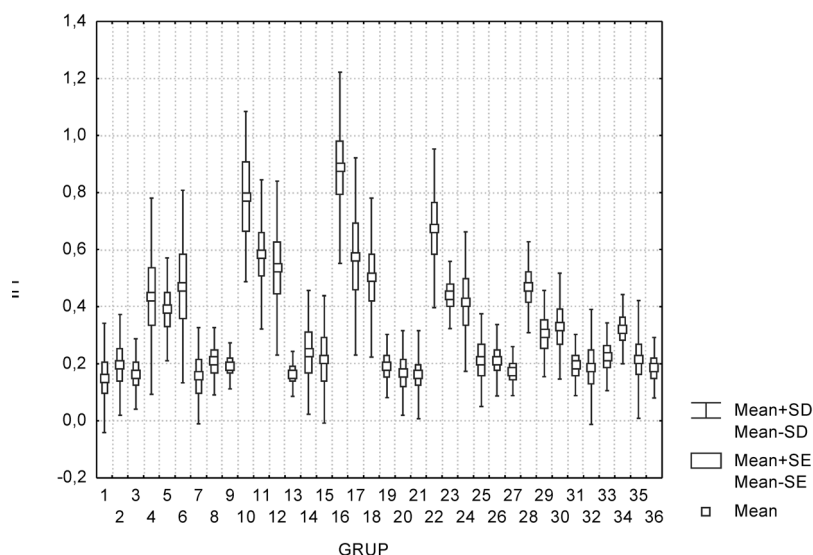


Рис. 2. Рівень лейкоцитарного індексу інтоксикації (ЛІІ) протягом місяця після опіку шкіри та його корекції колоїдними гіперосмолярними розчинами.

**Позначення:** ЛІІ – шкала рівня лейкоцитарного індексу інтоксикації.

а у тварин, яким вводили ізотонічний розчин через 7 діб після опіку. У щурів, яким вводили лактопротеїн-С та НАЕС-ЛХ-5% через 30 діб після опіку даний показник статистично значуще не відрізнявся від показників у щурів без опіку, тобто досягнув норми.

**Висновки.**

1. При опіковій хворобі частина клітин тимуса, надниркових залоз та аденогіпофіза у щурів гине, а динаміка їх загибелі залежить від терміну експерименту та застосованої інфузійної терапії, яка впливає на ступінь ендогенної інтоксикації.

2. Застосування лактопротеїну-С та НАЕС-ЛХ-5% у перші 7 діб експерименту призводить до статистично значущого зменшення рівня молекул середньої маси у щурів без опіку шкіри, а ЛІІ у тварин даних груп практично не відрізнявся від щурів, що отримували ізотонічний розчин. Найвищі показники рівня ендогенної інтоксикації (як молекул середньої маси, так і ЛІІ) у щурів після опіку шкіри, що отримували ізотонічний розчин встановлені через 3 і 7 діб від початку експерименту.

3. Застосування розчинів лактопротеїну-С та НАЕС-ЛХ-5% призводить до статистично значущого зниження рівня ендогенної інтоксикації (як молекул середньої маси, так і ЛІІ), порівняно з щурами, що отримували після опіку шкіри ізотонічний розчин, починаючи з 3 доби до кінця експерименту. Лише через 30 діб після опіку шкіри у щурів, яким вводили лактопротеїн-С та НАЕС-ЛХ-5% ЛІІ статистично значуще не відрізнявся від показників у щурів без опіку.

**Перспективи подальших досліджень.**

В подальших дослідженнях необхідно вивчити динаміку ультраструктурних змін у різних ендокринних клітинах тимуса, надниркових залоз та аденогіпофіза після опіку

шкіри та корекції його наслідків інфузійними колоїдно-гіперосмолярними розчинами, що дозволить після клінічної апробації застосувати розчин НАЕС-ЛХ-5% при комплексному лікуванні опікової хвороби.

Рецензент: член-кор. НАМН України, д.мед.н., професор Чайковський Ю.Б.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Корякина Е.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений : обзор литературы / Е.В. Корякина, С.В. Белова // *Клин. лаб. диагностика.* – 2004. – № 3. – С. 3-8.
2. Ожоговый шок: оптимизация интенсивной терапии / В.К. Гусак, В.П. Шано, Ю.В. Заяц [и др.] // *Український медичний часопис.* – 2002. – Т. 31, № 5. – С. 84-88.
3. Оценка тяжести эндогенной интоксикации и выбор метода детоксикационной терапии у обожженных по данным лейкоцитограммы и биохимического мониторинга / В.К. Гусак, Э.Ц. Фисталь, И.И. Сперанский [и др.] // *Клин. лаб. диагностика.* – 2000. – № 10. – С. 36.
4. Яворская В.А. Исследование уровня молекул средней массы и процессов перекисного окисления липидов в крови больных с разными формами инсульта / В.А. Яворская, А.М. Белоус, А.Н. Мохамед // *Журн. неврологии и психиатрии.* – 2000. – № 1. – С. 48-51.
5. Cohen J. The detection and interpretation of endotoxemia / J. Cohen // *Intens. Care Med.* – 2000. – Vol. 26 (suppl. 1). – P. 51-56.
6. Kroemer G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature on Cell Death / G. Kroemer, L. Galuzzi, P. Vandenabeele // *Cell death Differ.* – 2009. – Vol. 16. – P.1-3.

**ДИНАМИКА РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ В ТИМУСЕ, НАДПОЧЕЧНИКАХ, АДЕНОГИПОФИЗЕ И ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ИНФУЗИИ КОМБИНИРОВАННЫХ ГИПЕРОСМОЛЯРНЫХ РАСТВОРОВ**

Гунас И.В.<sup>1</sup>, Черкасов Э.В.<sup>2</sup>, Дзевульська И.В.<sup>2</sup>, Ковальчук А.И.<sup>2</sup>

*Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова, г. Винница, Украина<sup>1</sup>*

*Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина<sup>2</sup>*

**Резюме.** В статье представлены результаты исследований уровня эндогенной интоксикации у крыс в течение месяца после ожога кожи II–III степени, площадью 21–23 % поверхности тела и ее коррекции инфузионными растворами Лактопротеина с сорбитолом и HAES-LX-5%, а также влияние исследуемых препаратов на организм без моделирования патологического состояния. Установлены существенно более низкие показатели уровня эндогенной интоксикации у крыс без ожога, по сравнению с животными с ожогом. У животных, которым вводили исследуемые препараты, показатели интоксикации были статистически значимо меньше по сравнению с крысами, которым вводили изотонический раствор.

**Ключевые слова:** ожоговая травма, ультраструктурные модификации клеток, клеточная смерть, молекулы средней массы, лейкоцитарный индекс интоксикации, лактопротеин с сорбитолом, HAES-LX-5%, изотонический раствор.

**DYNAMICS ON DIFFERENT TYPES OF CELL DEATH IN THYMUS, SUPRARENAL GLAND, ADENOHYPHYSIS AND RESEARCH ON THE LEVEL OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN RATS UNDER THE CONDITION OF BURN DISEASE AND ITS TREATMENT BY THE INFUSION OF COMBINATED HYPEROSMOLAR SOLUTIONS**

Gunas I.V.<sup>1</sup>, Cherkasov E.V.<sup>2</sup>, Dzevulska I.V.<sup>2</sup>, Kovalchuk O.I.<sup>2</sup>

*National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine<sup>1</sup>*

*National Bogomolets Medical University, Kyiv, Ukraine<sup>2</sup>*

**Summary.** The article presents data in relation to the ultrastructural changes in thymus, suprarenal glands, adenohypophysis and on research the level of endogenous intoxication in rats for a month after the skin burn of II–III degree, 21–23 % of the body surface area and its correction by infusion solutions of lactoprotein with sorbitol and HAES-LX-5% and, also, described the influence of study drugs on the organism without modeling of pathological condition. Established significantly lower level of the endogenous intoxication in rats without burn compared with animals with burn of the skin. In animals injected with the study medication, rates of endogenous intoxication were statistically significantly lower compared with rats injected with isotonic solution.

**Key words:** burn injury, ultrastructural modification of cells, cell death, molecules of the average mass, leukocyte index of intoxication, lactoprotein with sorbitol, HAES-LX-5%, isotonic solution.