

УДК 616-001.17:599.323.4:591.24:576.36
DOI: 10.24061/1727-0847.16.1.2017.69

І.В. Булько

*Кафедра анатомії людини (зав. – доц. В.О. Тихолаз)
Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова*

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ КЛІТИН СЕЛЕЗІНКИ У ВІДДАЛЕНИЙ ПЕРІОД ПІСЛЯ ОПІКОВОЇ ТРАВМИ ШКІРИ У ЩУРІВ

Резюме. За допомогою проточної ДНК-цитометрії проведено дослідження динаміки показників клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин селезінки у щурів на тлі термічного опіку шкіри. Впродовж усього віддаленого періоду після опікової травми шкіри (14-30 діб) на тлі термічного ураження шкіри та застосування впродовж перших 7 діб після опіку 0,9% розчину NaCl у клітинах селезінки виявлялось статистично значуще збільшення числа подій в інтервалі SUB-G0G1 (більше у 2,05-2,8 рази впродовж усього періоду дослідження порівняно з групою тварин без опіку), а також реєструвались суттєво більші значення показників блоку проліферації ($p < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками клітинного циклу клітин селезінки тварин без опіку шкіри. На останньому етапі дослідження (30 діб) порівняно з попереднім етапом (21 доба) відзначено статистично значуще зменшення кількості клітин селезінки, що перебували у фазі G0G1 ($p < 0,05$), а також реєструвались суттєво більші значення показників S-фази ($p < 0,05$), інтервалу SUB-G0G1 ($p < 0,01$), індексу та блоку проліферації ($p < 0,05$).

Ключові слова: селезінка, клітинний цикл, опік, проточна ДНК-цитометрія, щур.

Дослідження останніх років довели, що опіки шкіри пов'язані із запаленням та імунною дисфункцією [1]. Опікова травма викликає складну реакцію відповіді у хворого, руйнує гомеостаз імунної системи та призводить до розвитку інфекційних і запальних ускладнень [2]. Описані особливості деструктивних та репаративних процесів у центральному органі імунної системи – тимусі [3].

Процеси перебудови в органах імуногенезу (кістковий мозок, селезінка, лімфатичні вузли) мають певну динаміку. Для селезінки як органа детоксикації та імунокорекції, залученого до великого кола кровообігу, характерними є наступні функції: механічна фільтрація крові з поглинанням ксенобіотиків; функція клітинної матриці, що містить макрофаги, лімфоцити та натуральні килери; синтез гуморальних чинників імунітету, опсонінів, тафтсину, фібронектину, інтерферону та інших чинників, які стимулюють імунні реакції [4]. У селезінці виявлено редукцію фолікулів, помірну гіперплазію лімфоїдних і ретикулярних клітин за умов опіку [5].

Унаслідок своєї здатності елімінувати чужорідні антигени, власні мутантні та відмираючі клітини, селезінка є потужним захисним органом. У

ній, в першу чергу, синтезуються антитіла на первинно введений антиген і активізується захисна клітинна реакція на рівні лімфоцитів. Екстракорпоральна перфузія донорської свинячої селезінки кров'ю пацієнта була основним методом впливу, який використовують за тяжких форм ендотоксикозу, під час шоківих станів. У зв'язку з вищеведеним, подальший прогрес у розробці цієї проблеми потребує комплексного та більш глибокого підходу до встановлення патогенезу системних і місцевих розладів, які виникають в організмі опікових хворих внаслідок порушень гомеостазу у відповідь на дію термічного фактору. Селезінка у таких випадках не може розглядатися як вторинний орган, оскільки її функція забезпечує підтримку життєдіяльності організму [6]. Проведені субмікроскопічні дослідження селезінки встановили, що опікова хвороба вже на ранніх термінах свого розвитку призводить до початку глибоких змін усіх структурних компонентів селезінки [7].

Клітинні механізми вторинного ураження селезінки є недостатньо вивченими, а дані про апоптоз і проліферацію клітин селезінки за вторинного ураження суперечливі, що не дозволяє в достатньо повному обсязі розробити ефективні і патогенетично обґрунтовані методи лікування та

профілактики вторинних опікових уражень цього органа.

Мета дослідження: з'ясувати динаміку показників клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин селезінки у щурів на тлі термічного опіку шкіри у віддалений післяопіковий період методом проточної ДНК-цитометрії.

Матеріал і методи. Експериментальні дослідження були виконані на 24 білих статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г, отриманих із віварію Державної установи "Інститут фармакології та токсикології НАМН України". Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались рекомендацій Європейської комісії щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин та методичними рекомендаціями Державного фармакологічного центру МОЗ України. Досліди проводились з урахуванням "Правил доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)". Дослідження проводили в лабораторії кафедри фармакології ВНМУ, сертифікованої ДФЦ МОЗУ. Тварини були розподілені на 2 групи.

До контрольної групи № 1 належали 8 тварин без термічної травми, яким упродовж 7 діб проводили внутрішньовенну інфузію в нижню порожнисту вену 0,9% розчину NaCl у дозі 10 мл/кг, для чого виконували катетеризацію стегнової вени та просували катетер до нижньої порожнистої вени. Катетер у стегновій вені підшивався 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 розчину.

Групу № 2 складали щури з опіком шкіри (16 тварин), яким також протягом перших 7 діб після опіку проводили внутрішньовенну інфузію в нижню порожнисту вену 0,9% розчину NaCl. Інфузії виконувались 1 раз на добу.

Катетеризацію магістральних судин здійснювали в умовах пропофолового наркозу 60 мг/кг внутрішньоочеревино.

Опікову травму викликали шляхом прикладання 4-х мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали впродовж 6-ти хв. у воді на дерев'яній підставці з постійною температурою 100°C. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складає 21-23% при експозиції 10 с, що є достатнім для формування опіку II ступеня та шокового стану середнього ступеня тяжкості. Евтаназію щурів проводили шляхом передозування пропофолу через 30 діб.

Вміст ДНК в ядрах клітин селезінки щурів визначався методом проточної ДНК-цитометрії. Суспензії ядер з клітин селезінки щурів отримували за допомогою розчину для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 1 фірми Partec, Німеччина, відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний набір дозволяє виконувати екстракцію ядер та маркувати ядерну ДНК діамідинофенілндолом (DAPI). У процесі виготовлення суспензій ядер використовували фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec, Німеччина. Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії реєструвалось 20 тис. подій. Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина), де визначались: G0G1 – відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК=2с); S – відсоткове співвідношення клітин 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, або поліплоїдні). 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.

Результати дослідження та їх обговорення. Для диференційованої оцінки впливу опікової травми шкіри розчин NaCl, лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% на стан клітинного циклу селезінки, нами проведено дослідження показників проточної ДНК-цитометрії клітин селезінки у щурів без опікової травми шкіри на 14, 21, 30 добу експерименту (табл. 1).

Отримані нами результати дослідження вмісту ДНК у клітинах селезінки тварин без опіку шкіри, яким вводили 0,9% розчин NaCl, вказують на переважання клітин у неактивну фазу G0G1, значно меншу кількість клітин, що перебувають у стані проліферації (S фаза, G2+M фаза), та певну кількість клітин (SUB-G0G1) у стані апоптозу (рис. 1).

Достовірних відмінностей між аналогічними показниками клітинного циклу і фрагментації ДНК клітин впродовж усіх термінів дослідження (14, 21 та 30 доба) виявлено не було.

Вплив опікової травми на динаміку показників клітинного циклу та фрагментації ДНК селезінки у віддалений період після опікової травми

шкіри у щурів вивчали на тлі корекції наслідків опіку шкіри 0,9% розчином NaCl.

На тлі термічного ураження шкіри та застосування впродовж перших 7 діб після опіку 0,9% розчину NaCl у клітинах селезінки виявлялось суттєво значуще збільшення числа подій в інтервалі SUB-G0G1 (більше у 2,05 - 2,8 рази впродовж усього періоду дослідження, у порівнянні з групою тварин без опіку). Упродовж усього віддаленого періоду після опікової травми шкіри (14-30 діб) реєструвались суттєво більші значення показників блоку проліферації ($p < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками клітинного циклу клітин селезінки тварин без опіку шкіри, яким вводили 0,9% розчин NaCl у відповідний термін експерименту (табл. 2).

На останньому етапі дослідження (30 діб) порівняно з попереднім етапом (21 доба) відзначено

статистично значуще зменшення кількості клітин селезінки, що перебували у фазі G0G1 ($p < 0,05$), а також реєструвались суттєво більші значення показників S-фази ($p < 0,05$), інтервалу SUB-G0G1 ($p < 0,01$), індексу та блоку проліферації ($p < 0,05$). Одержані результати свідчать, що за стандартної корекції 0,9% розчином NaCl у віддалений період після опікового ураження шкіри відбувається суттєве порушення клітинного циклу селезінки, яке полягає в статистично значущому підвищенні числа подій в інтервалі SUB-G0G1 ($p < 0,05$).

Характерні показники клітинного циклу клітин селезінки на 30 добу зафіксовані на ДНК-гістограмі ядерної суспензії клітин селезінки щура після опіку шкіри та застосування 0,9% розчину NaCl (рис. 2).

Таким чином, внутрішньовенна інфузія щурам без опіку шкіри протягом 7 діб 0,9% розчину

Таблиця 1

Показники клітинного циклу клітин селезінки у щурів без опікової травми шкіри, яким протягом перших 7 діб вводили розчин NaCl, через 14, 21 і 30 діб від початку експерименту ($M \pm \sigma$)

| Доба | Показники клітинного циклу | | | | | |
|------|----------------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| | G0G1 | S | G2+M | IP | SUB-G0G1 | BP |
| 14 | 84,03± 1,33 | 4,48± 1,48 | 11,48± 1,74 | 15,96± 1,33 | 4,35± 0,97 | 0,39± 0,02 |
| 21 | 85,40± 1,88 | 3,85± 0,69 | 10,75± 1,77 | 14,60± 1,89 | 4,09± 0,54 | 0,36± 0,04 |
| 30 | 86,39± 3,38 | 3,95± 0,78 | 9,64± 1,85 | 13,59± 2,37 | 5,09± 0,64 | 0,40± 0,04 |

Примітка: 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, що визначається за сумою показників S+G2+M; BP – блок проліферації, що оцінюється за співвідношенням S/(G2+M)

Таблиця 2

Показники клітинного циклу клітин селезінки у віддалений період після опікової травми шкіри у щурів, яким протягом перших 7 діб вводили 0,9% розчин NaCl ($M \pm \sigma$)

| Доба | Показники клітинного циклу | | | | | |
|------|----------------------------|--------------|------------|--------------|--------------|-------------|
| | G0G1 | S | G2+M | IP | SUB-G0G1 | BP |
| 14 | 83,47±3,12 | 5,04±0,76 | 11,49±2,56 | 16,53±3,12 | 12,41±2,54* | 0,44±0,02* |
| 21 | 85,27±1,58 | 4,70±0,57 | 10,03±2,84 | 14,73±2,08 | 8,39±1,22 * | 0,46±0,04* |
| 30 | 81,69±1,61# | 6,85±0,70 *# | 11,47±1,28 | 18,32±1,41*# | 11,28±0,92*# | 0,59±0,04*# |

Примітка: * – статистично значущі відмінності ($p < 0,05-0,01$) за критерієм Манна-Уїтні між показником клітинного циклу відповідної групи після опіку та аналогічним показником тварин без опіку у той же термін експерименту; # – статистично значущі відмінності ($p < 0,05-0,01$) за критерієм Манна-Уїтні між показником клітинного циклу відповідної групи після опіку та аналогічним показником попереднього терміну дослідження

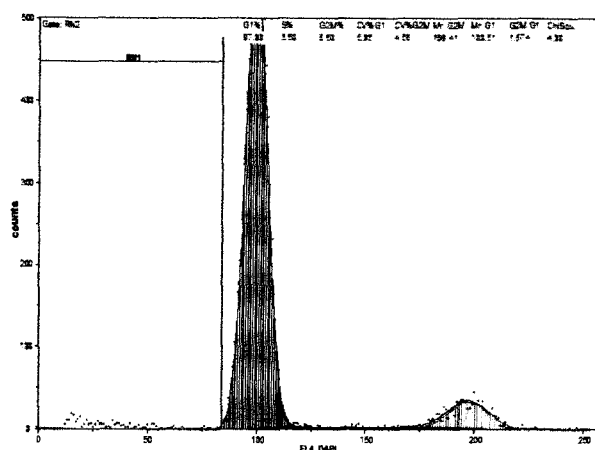


Рис. 1. ДНК-гістограма ядерної суспензії клітин селезінки щура без опіку шкіри після застосування 0,9% розчину NaCl, 30 доба дослідження. RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 4,59%

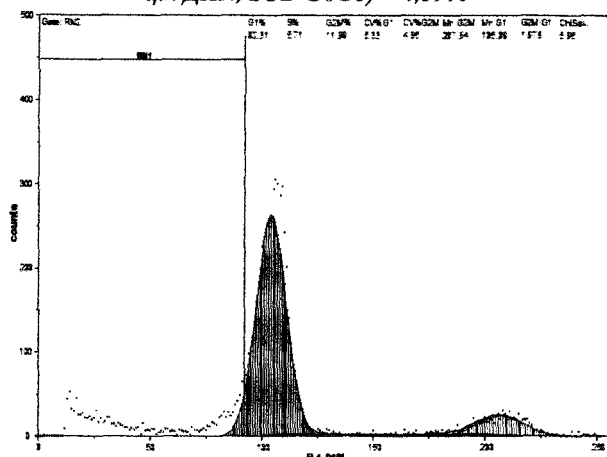


Рис. 2. ДНК-гістограма ядерної суспензії клітин селезінки щура після опіку шкіри та застосування 0,9% розчину NaCl, 30 доба дослідження. RN1 (Фрагментація ДНК, SUB-G0G1) – 10,19%

NaCl, не змінює показники клітинного циклу селезінки (G0G1-фаза, S-фаза і G2+M-фаза) і фраг-

ментації ДНК (інтервал SUB-G0G1) через, 14, 21 та 30 діб спостереження, що вказує на наявність певного балансу між процесами синтезу ядерної ДНК та апоптозу

Термічне ураження шкіри викликає збільшення кількості клітин селезінки, що перебували у фазі синтезу ДНК (S-фазі клітинного циклу) та показників фрагментації ДНК (активація апоптозу), що може свідчити про наявність явищ активації репаративних процесів у селезінці.

Висновки. 1. Упродовж усього віддаленого періоду після опікової травми шкіри (14-30 діб) на тлі термічного ураження шкіри та застосування впродовж перших 7 діб після опіку 0,9 % розчину NaCl у клітинах селезінки виявлялось статистично значуще збільшення числа подій в інтервалі SUB-G0G1 (більше у 2,05-2,8 рази впродовж усього періоду дослідження, у порівнянні з групою тварин без опіку), а також реєструвались суттєво більші значення показників блоку проліферації ($p < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками клітинного циклу клітин селезінки тварин без опіку шкіри. 2. На останньому етапі дослідження (30 діб) порівняно з попереднім етапом (21 доба) відзначено статистично значуще зменшення кількості клітин селезінки, що перебували у фазі G0G1 ($p < 0,05$), а також реєструвались суттєво більші значення показників S-фази ($p < 0,05$), інтервалу SUB-G0G1 ($p < 0,01$), індексу та блоку проліферації ($p < 0,05$).

Перспективи подальших досліджень. У подальших дослідженнях доцільно вивчити показники клітинного циклу клітин селезінки після опіку шкіри II-III ступеня за використання комплексних інфузійних колоїдно-гіперосмолярних розчинів лактопротеїну з сорбітолом і HAES-LX-5%.

Список использованной литературы

1. Simvastatin reduces burn injury-induced splenic apoptosis via downregulation of the TNF- α /NF- κ B pathway / G. Zhao, Y.M. Yu, M. Kaneki [et al.] // *Ann. Surg.* – 2015. – Vol. 261, № 5. – P. 1006-1012.
2. Stoecklein V.M. Trauma equals danger – damage control by the immune system / V.M. Stoecklein, A. Osuka, J.A. Lederer // *J. Leukoc. Biol.* – 2012. – Vol. 92, № 3. – P. 539-551.
3. Чайковський Ю.Б. Структурні модифікації тілець тимуса (тілець Гассала) за умов експериментальної опікової хвороби та її лікування шляхом інфузії лактопротеїну з сорбітолом / Ю.Б. Чайковський, Е.В. Черкасов // *Вісн. морфолог.* – 2016. – Т. 22, № 1. – С. 70-75.
4. Long-term persistence of the pathophysiologic response to severe burn injury / M.G. Jeschke, G.G. Gauglitz, G.A. Kulp, [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(7). – P. 21245.
5. Анализ летальных исходов у детей при ожоговой болезни / С.П. Сахаров, В.В. Иванов, О.М. Зороастров, М.О. Зороастров // *Вестн. эксперимент. и клин. хирург.* – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 256-259.
6. Гаврилюк-Скиба Г.О. Динаміка змін макрометричних та морфометричних показників селезінки після експериментальної термічної травми / Г.О. Гаврилюк-Скиба, К.С. Волков, З.М. Небесна // *Biomedical and Biosocial Anthropology.* – 2013. – № 20. – С. 45-48.
7. Гаврилюк-Скиба Г.О. Субмікроскопічні зміни структурних компонентів селезінки в ранні терміни після опікової травми в експерименті / Г.О. Гаврилюк-Скиба, К.С. Волков // *Світ мед. та біолог.* – 2013. – № 1(36). – С. 112-116.

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ОЖГОВОЙ ТРАВМЫ КОЖИ КРЫС

Резюме. При помощи проточной ДНК-цитометрии проведено исследование динамики показателей клеточного цикла и фрагментации ДНК клеток селезенки крыс на фоне термического ожога кожи. В течение всего отдаленного периода после ожоговой травмы кожи (14-30 суток), на фоне термического поражения кожи и применения в течение первых 7 дней после ожога 0,9% раствора NaCl, в клетках селезенки определялось статистически значимое увеличение числа событий в интервале SUB-G0G1 (больше в 2,05-2,8 раза в течение всего периода исследования по сравнению с группой животных без ожога), а также регистрировались существенно большие значения показателей блока пролиферации ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями клеточного цикла клеток селезенки животных без ожога кожи. На последнем этапе исследования (30 суток) по сравнению с предыдущим этапом (21 сутки) отмечено статистически значимое уменьшение количества клеток селезенки, которые пребывали в фазе G0G1 ($p < 0,05$), а также регистрировались существенно большие значения показателей S-фазы ($p < 0,05$), интервала SUB-G0G1 ($p < 0,01$), индекса и блока пролиферации ($p < 0,05$).

Ключевые слова: селезенка, клеточный цикл, ожог, проточная ДНК-цитометрия, крыса.

FEATURES OF THE CELL CYCLE OF SPLEEN CELLS IN THE LATE PERIOD AFTER BURN INJURIES OF RATS' SKIN

Abstract. Using flow-through DNA cytometry, a study of the dynamics of cell cycle indices and fragmentation of spleen cell DNA in rats during thermal burn of the skin was performed. During the entire late period after the burn injury of the skin (14-30 days) against the background of the thermal damage of the skin and application during the first 7 days after burning 0.9% NaCl solution in the cells of the spleen, there was a statistically significant increase in the number of events in the range of SUB-G0G1 (more than 2.05-2.8 times throughout the study period, compared with non-burning animals), and significantly higher values of the parameters of the proliferative unit ($p < 0.05$) were recorded compared to similar parameters of the cell cycle of the spleen cells of the animals without skin burns. At the last stage of the study (30 days), compared to the previous stage (21 days), a statistically significant decrease in the number of cells in the spleen in the G0G1 phase ($p < 0.05$) was noted, and significant significantly higher values of the S-phase ($p < 0.05$), the interval SUB-G0G1 ($p < 0.01$), the index and block of proliferation ($p < 0.05$).

Key words: spleen, cell cycle, burn, flowing DNA cytometry, rat.

National Pirogov Memorial Medical University (Vinnytsya)

Надійшла 07.06.2017 р.

Рецензент – проф. Слободян О.М. (Чернівці)