

© Гунас І.В., Кондрацький Б.О., Черкасов Е.В., Черешнюк І.Л., Лисенко Д.А.

УДК: 616-001.17:615.348:616.8

**Гунас І.В. \*, Кондрацький Б.О. \*\*, Черкасов Е.В. \*\*\*, Черешнюк І.Л. \*, Лисенко Д.А. \***

\*Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018);

\*\*ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України" (вул. Чупринки, 45, м. Львів, 79044 Україна);

\*\*\*Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (бульв. Т. Шевченка, 1, м. Київ, Україна, 01023)

## НАСЛІДКИ ВПЛИВУ ОПІКУ ШКІРИ НА ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ КЛІТИН ТИМУСУ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ЛАКТОПРОТЕЇНОМ З СОРБІТОЛОМ АБО НАЕС-LX 5 %

**Резюме.** В статті представлені результати дослідження показників кінетики клітинного циклу клітин тимусу щурів після термічного опікового uszkodження шкіри на фоні застосування 0,9% розчину NaCl, препаратів лактопротеїну з сорбітолом або НАЕС-LX 5%. Опікове uszkodження шкіри на фоні застосування 0,9% розчину NaCl призводить до порушення клітинного циклу клітин тимусу, максимально вираженого через 1 та 3 доби спостереження. Застосування препаратів лактопротеїну з сорбітолом або НАЕС-LX 5% дозволяє суттєво покращити показники клітинного циклу клітин тимусу і зменшити негативний вплив опікового uszkodження: лактопротеїну з сорбітолом за рахунок впливу на синтез ДНК (S-фазу), а препарату НАЕС-LX 5% на апоптоз, що проявляється зменшенням фрагментації ДНК (SUB-G0G1).

**Ключові слова:** тимус, клітинний цикл, опік, ДНК-цитометрія, лактопротеїн з сорбітолом, НАЕС-LX 5%.

### Вступ

Ключову роль в розвитку поліорганної недостатності при опіковій хворобі (ОХ) відіграють зміни на клітинному й молекулярному рівнях, а саме uszkodження клітинного циклу в уражених органах і зокрема в тимусі, що запускає наступний етап ОХ із декомпенсацією всіх систем життєдіяльності [Спиридонова, 2007]. Для корекції ураження імунної системи при опіковій хворобі запропоновано [Demling, 2008] проведення комплексних заходів: рання некректомія, дезінтоксикаційна терапія, ефективне знеболювальне лікування, імунокорекційні препарати. Одним із основних механізмів, що забезпечують ефективність інфузійної терапії, є достовірне зменшення кількості інфекційних ускладнень, що беззаперечно вказує на зменшення токсичного впливу метаболітів, які виникають на фоні опікового ураження на імунні органи, зокрема й тимус, як один із важливих механізмів ефективності даного виду терапії [Tricklebank, 2009].

Проводяться постійні випробування та дослідження щодо застосування нових засобів інфузійної терапії, які б дозволили ефективно контролювати токсемію при максимальному зниженні можливих побічних ефектів [Kasten, Makley, Kagan, 2011, Носенко, 2010]. Доведено, що введення інфузійних препаратів зменшує активність цитокінів запалення, що викликають імунодефіцит, паралельно суттєво покращуючи прогноз, зменшуючи смертність і поліорганне ураження, яке є одним із основних проявів ОХ [Dai, Wu, Meng et al., 2012]. Припускається, що саме активна інфузійна терапія попереджує акцидентальне виснаження тимусу, створюючи передумови до збереження нормальної імунної відповіді на опікове пошкодження, та, відповідно, зменшуючи вірогідність розвитку інфекційних ускладнень, а у випадку розвитку таких - суттєво полегшує їх перебіг та зменшує летальність [Kasten, Makley, Kagan, 2011]. Лише в одиничних дослідженнях проводилась оцінка впливу інфузійної терапії на імунні органи, зокрема й тимусу.

Так, призначення галавіту при ОХ призводить до покращення стану клітинної й гуморальної ланки імунітету, дає змогу в 1,7 рази знизити летальність у тяжко обпечених [Носенко, 2010]. Нами не знайдено даних про дослідження показників клітинного циклу клітин тимусу на фоні застосування різних режимів інфузійної терапії та впливу ОХ на ці показники, визначені методом проточної ДНК-цитометрії. Одиничні роботи, присвячені дослідженню показників клітинного циклу в тимусі були проведені в 70-х роках за методиками, що є недостатніми відносно об'єктивної оцінки поділу клітин [Asko-Seljavaara, 1974].

Метою даної роботи було вивчення за допомогою методу проточної ДНК-цитометрії динаміки показників клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин тимусу у щурів, яким корекція наслідків дермального опіку II-III ступеня, площею 21-23% проводилась 0,9% розчином NaCl, препаратами лактопротеїн з сорбітолом або НАЕС-LX 5%.

### Матеріали та методи

Експериментальне дослідження динаміки показників клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин тимусу при опіковій хворобі (через 1, 3, 7, 14, 21 і 30 діб) виконано на 216 щурах-самцях лінії Вістар масою 155-160 грамів на базі Науково-дослідного центру (завідувач - професор І.В. Гунас) Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. 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 доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)". Тварини були розділені на 6 груп (по 36

тварин у кожній групі): I, II, III - щури без термічної травми, яким проводилась окрема інфузія 0,9% розчину NaCl, лактопротеїну з сорбітолом або HAES-LX 5 % у дозі 10 мл/кг; IV, V, VI - 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°C. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складала 21-23 % при експозиції 10 сек, що є достатнім для формування опіку II-III ступеня та розвитку шокового стану середнього ступеня важкості.

0,9% розчин NaCl 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 0,9% розчину NaCl. Перше введення 0,9% розчину NaCl здійснювали через 1 годину після моделювання патологічного стану, наступні інфузії виконували щоденно впродовж 7 діб. Забір матеріалу проводився під наркозом. У тварин після декапітації робили розтин грудної порожнини і вирізали за допомогою леза невеликі шматочки тимуса.

Вміст ДНК в ядрах клітин тимусу щурів визначався методом проточної цитометрії. Суспензії ядер з клітин тимуса отримували за допомогою спеціального розчину для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA фірми Partec, Німеччина, відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний розчин дозволяє швидко та одночасно виконувати екстракцію ядер і маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI), який входить до його складу. У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались спеціальні одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина). Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec, Німеччина, в НДЦ ВНМУ імені М.І. Пирогова. Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 20 тис. подій. Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) у повній цифровій відповідності згідно математичної моделі, де визначались: 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 проліфе-

рації, який визначається за сумою показників S + G2 + M; BP - блок проліферації, який оцінюється по співвідношенню S/(G2 + M) (збільшення числа клітин в фазі G2 + M при низьких значеннях S-фази свідчить про затримку проліферації в стадії G2 + M). 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.

Статистична обробка отриманих результатів була проведена в пакеті "STATISTICA 6.1" (належить НДЦ ВНМУ імені М.І. Пирогова, ліцензійний № ВХХR901E246022FA) із застосуванням непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним із отриманих варіаційних рядів, середні значення кожної ознаки, що вивчалася та стандартне квадратичне відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерія Мана-Уїтні.

### Результати. Обговорення

Для виключення можливого впливу 0,9% розчину NaCl, лактопротеїну з сорбітолом, або HAES-LX 5 % на нормальний цикл клітин тимусу нами було проведено дослідження показників клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин тимусу у щурів без опікового ураження шкіри (табл. 1.).

Достовірних відмінностей між аналогічними показниками клітинного циклу клітин тимусу у групах тварин без опікового ураження, які отримували 0,9 % розчин NaCl та групами тварин, яким проводилось введення препаратів лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX 5 % нами не встановлено. Це свідчить про відсутність впливу досліджуваних препаратів на нормальні процеси проліферації та апоптозу клітин тимусу.

При порівнянні показників клітинного циклу клітин тимусу через 1-у добу після опіку шкіри у тварин, яким проводилась корекція 0,9 % розчином NaCl, препаратами лактопротеїном з сорбітолом або HAES-LX 5 % були виявлені суттєві зміни основних показників у порівнянні з групою тварин без опікового ушкодження (табл. 2), які полягали у зменшенні відсотку клітин, що перебували в фазі синтезу ДНК - S ( $p < 0,05$ ). Також у всіх групах досліджуваних тварин на фоні опіку в даний термін спостерігалось статично значуще збільшення відсотку клітин з фрагментованою ДНК (інтервал SUB-G0G1), тобто з ознакою апоптозу.

На фоні опіку та застосуванні препаратів лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX 5 %, суттєвих відмінностей в основних показниках клітинного циклу (G0G1, S та G2 + M) від аналогічних показників групи, де проводилась корекція 0,9 % розчином NaCl, не виявлено ( $p > 0,05$ ). Тобто, у всіх трьох групах, де викликався опік, спостерігалось суттєве збільшення клітин у фазу G0G1 та зменшення клітин у фазі S. Відмітимо виражену тенденцію ( $p = 0,055$ ) в показниках фази G0G1 між групами

**Таблиця 1.** Показники клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин тимусу в шурів без опікового ураження шкіри на фоні застосування 0,9% розчину NaCl, лактопротеїну з сорбітолом, або HAES-LX 5 % за даними проточної ДНК-цитометрії (M±σ).

Інфузійні розчини	Доба	G0G1	S	G2+M	IP	BP	SUB-G0G1
0,9 % розчин NaCl	1	70,32±4,66	8,925±2,654	20,76±4,04	29,69±4,66	0,447±0,165	2,608±0,536
	3	71,70±8,70	7,782±3,357	20,52±5,64	28,30±8,70	0,370±0,085	2,172±0,788
	7	70,38±6,87	8,250±2,444	21,31±4,88	29,56±6,88	0,388±0,073	2,483±0,633
	14	69,86±4,34	8,315± 2,861	21,83± 2,33	30,14± 4,34	0,380± 0,130	2,442±0,641
	21	70,86±1,91	8,480±1,269	20,60±1,32	29,08±2,01	0,412±0,060	2,098±0,871
	30	71,86±4,11	7,635±2,416	20,51±4,66	28,14±4,11	0,402±0,194	2,250±0,921
Лактопротеїн з сорбітолом	1	69,49±4,47	7,900±4,349	22,62±1,46	30,52±4,46	0,348±0,198	2,692±0,846
	3	70,68±4,19	8,327±2,553	21,00±4,29	29,32±4,19	0,420±0,187	2,357±0,493
	7	69,69± 3,80	8,302± 2,308	22,01± 1,79	30,31± 3,80	0,375± 0,088	2,263± 0,625
	14	68,31±5,62	8,782± 1,491	22,91±5,27	31,70± 5,62	0,403± 0,130	2,363± 0,517
	21	68,13± 3,19	8,997± 2,314	22,87± 1,11	31,87± 3,19	0,393± 0,093	2,247± 0,681
	30	68,24± 1,71	7,942± 1,982	23,82± 3,04	31,76± 1,71	0,347± 0,131	2,213± 0,472
HAES-LX 5 %	1	67,70± 4,18	9,840± 1,726	22,46± 2,80	32,30±4,18	0,440± 0,058	2,532± 0,914
	3	72,30± 8,41	7,582± 2,878	20,15± 5,73	27,73± 8,39	0,368± 0,065	2,243± 0,793
	7	68,24± 4,32	8,985± 2,107	22,78± 3,13	31,77± 4,32	0,398± 0,098	2,367± 0,491
	14	69,35± 4,50	8,503± 2,189	22,15± 3,30	30,65± 4,50	0,388± 0,092	2,568± 0,633
	21	72,20± 5,01	7,752± 2,522	20,05± 3,66	27,80± 5,01	0,393± 0,140	2,302± 0,763
	30	69,21± 7,60	7,982± 3,609	22,81± 4,54	30,79± 7,60	0,343± 0,114	2,107± 0,902

**Таблиця 2.** Показники клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин тимусу через 1 добу після опіку шкіри на фоні корекції 0,9 % розчином NaCl, препаратами лактопротеїном з сорбітолом, або HAES-LX 5 % за даними проточної ДНК-цитометрії (M±σ).

Показники клітинного циклу	Групи тварин			
	0,9 % розчин NaCl	Опік + розчин 0,9 % NaCl	Опік + лактопротеїн з сорбітолом	Опік+ HAES-LX 5 %
G0G1	70,32±4,66	83,12±4,47*	78,18±3,72*	79,12±5,42*
S	8,925±2,654	4,275±1,846*	4,608±1,295*	5,365±1,680*
G2 + M	20,76±4,04	12,60±4,93*	17,11±2,90	15,51±4,84
IP	29,69±4,66	16,88±3,69*	21,72±3,60*	20,88±5,42*
SUB-G0G1	2,608±0,536	11,90± 4,46*	8,458±1,178*	7,588±1,156*, *
BP	0,447±0,165	0,415±0,325	0,270±0,070*	0,372±0,124

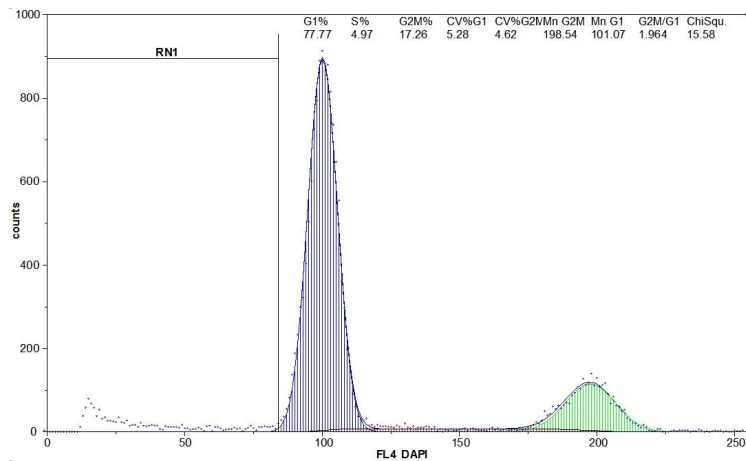
**Примітки:** (тут і в подальшому): 1. \* - позначена статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) порівняно з групою тварин без опіку; 2. \* - позначена статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) за порівняно з групою тварин Опік + 0,9 % розчин NaCl.

**Таблиця 3.** Показники клітинного циклу клітин тимусу через 3 доби після опіку шкіри та на фоні корекції 0,9 % розчином NaCl, препаратами лактопротеїном з сорбітолом, або HAES-LX 5 % за даними проточної ДНК-цитометрії (M±σ).

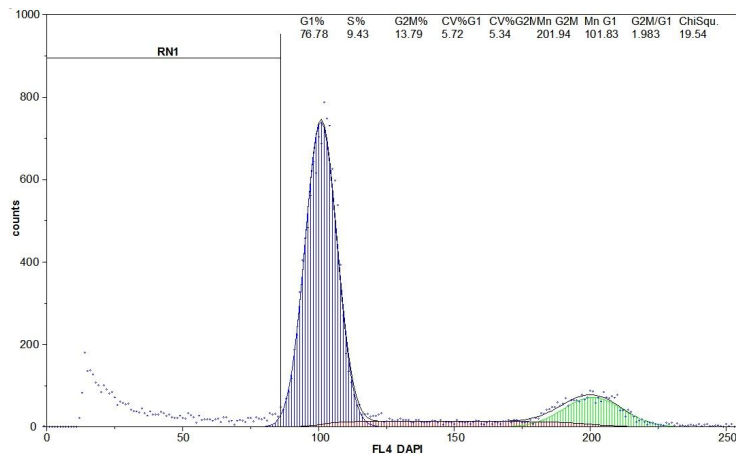
Показники клітинного циклу	Групи тварин			
	0,9 % розчин NaCl	Опік+0,9 % розчин NaCl	Опік+ лактопротеїн з сорбітолом	Опік+ HAES-LX 5 %
G0G1	71,70±8,70	65,64±7,55	70,43±3,28	68,73±3,07
S	7,782±3,357	12,54±3,48*	8,843±2,437*	8,987±3,171
G2 + M	20,52±5,64	21,82±4,78	20,73±2,00	22,18±0,98
IP	28,30±8,70	34,37±7,55	29,57±3,27	31,17±2,92
SUB-G0G1	2,172±0,788	12,03±3,20*	7,960±3,612*	6,110±1,565*, *
BP	0,370±0,085	0,580±0,110	0,428±0,119	0,407±0,153

опік + 0,9 % розчин NaCl та опік + лактопротеїн з сорбітолом. Всі ці показники статистично значущі ( $p < 0,05$ ) відрізнялись від відповідних показників, зафіксованих у клітинах тимусу у групі без опікового пошкодження. В той же час, варто відмітити, що найбільш суттєво відрізнялись показники інтервалу SUB-G0G1 в групі опік

+ HAES-LX 5 % (рис. 1) та опік + 0,9 % розчин NaCl ( $p < 0,05$ ), тоді як для цього ж показника групи опік + лактопротеїн з сорбітолом спостерігалась лише слабка тенденція ( $p = 0,078$ ). Це може вказувати на більш виражену захисну дію препарату HAES-LX 5 % відносно проапоптозного впливу опікового ураження.



**Рис. 1.** Приклад ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин тимусу через 1 добу після опікової травми шкіри на тлі застосування HAES-LX 5 %. RN1 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 6,82 %.



**Рис. 2.** Приклад ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин тимусу через 3 доби після опікової травми на тлі застосування 0,9 % розчином NaCl. RN1 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 15,61 %.

Також слід відмітити, що на фоні застосування лактопротеїну з сорбітолом проліферативний індекс мав виражену тенденцію до збільшення в порівнянні з аналогічним показником групи опік + 0,9 % розчин NaCl ( $p=0,055$ ). Результати отриманих даних можуть свідчити про позитивний вплив препаратів лактопротеїну з сорбітолом і більш суттєво HAES-LX 5 %, який проявляється шляхом зменшення апоптичного ушкодження клітин

тимусу на фоні опіку. Однак, різниці між показниками клітинного циклу клітин тимусу при застосуванні препаратів HAES-LX 5 % та лактопротеїну з сорбітолом через 1-у добу опікового ушкодження шкіри нами не виявлено ( $p>0,05$ ).

Через 3 доби після опікового ураження шкіри показники клітинного циклу клітин тимусу на фоні застосування 0,9 % розчину NaCl, препаратів лактопротеїну з сорбітолом або HAES-LX 5 % були дещо подібними аналогічним показниками кожної групи з корекцією через 1 добу після опікової травми шкіри (табл. 3).

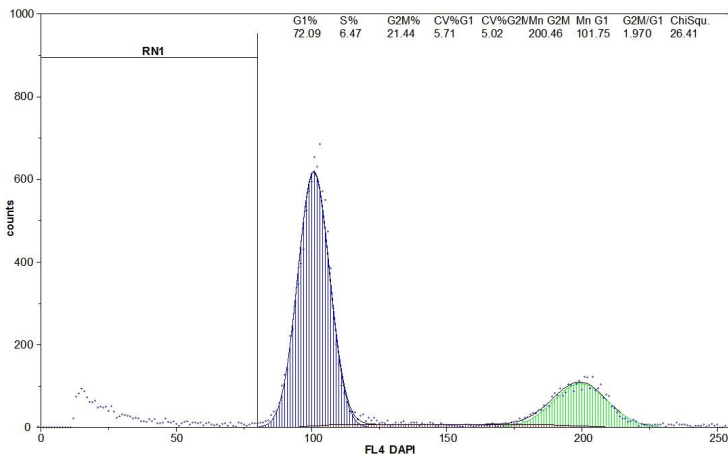
Різниці між показниками клітинного циклу клітин тимусу в групах, де застосовувались препарати HAES-LX 5 % та лактопротеїн з сорбітолом через 3 доби після опіку шкіри, не зафіксовано ( $p>0,05$ ). Однак, на фоні застосування лактопротеїну з сорбітолом показники S-фази статистично значуще відрізнялись від групи опік + 0,9 % розчин NaCl ( $p=0,037$ ) (рис. 2.), що, на нашу думку, свідчило про більш виражений вплив даного препарату на синтез ядерної ДНК клітин тимусу порівняно із HAES-LX 5 %.

Однак, на відміну від лактопротеїну з сорбітолом, застосування HAES-LX 5 % (рис. 3.) в цей термін дослідження призвело до суттєвого зменшення відсотку клітин з фрагментованою ДНК (SUB-G0G1) ( $p<0,05$ ), а також до вираженої тенденції зменшення блоку проліферації ( $p=0,055$ ).

Дещо несподіваною виявилась стабільність показників індексу IP та BP клітин тимусу через 1 та 3 доби після опікового ураження шкіри на фоні застосування 0,9 % розчину NaCl, або препаратів лактопротеїну з сорбітолом, або HAES-LX 5 %. В джерелах літератури нами не знайдено даних про дослідження цих показників на фоні опікового ушкодження та при його корекції. Отримані нами дані є такими, що потребують подальшого детального вивчення, оскільки можливо саме за рахунок співвідношення процесів гальмування або активації клітинної

**Таблиця 4.** Показники клітинного циклу клітин тимусу та фрагментації ДНК через 7 днів після опіку шкіри на фоні корекції 0,9 % розчином NaCl, препаратами лактопротеїн з сорбітолом, або HAES-LX 5 % за даними проточної ДНК-цитометрії ( $M \pm \sigma$ ).

Показники клітинного циклу	Групи тварин			
	0,9 % розчин NaCl	Опік+0,9 % розчин NaCl	Опік+ лактопротеїн з сорбітолом	Опік+ HAES-LX 5 %
G0G1	70,32±4,66	66,52±5,07	68,90±5,22	71,18±3,38
S	8,925±2,654	11,16±2,94	9,635±2,013	8,170±2,488
G2 + M	20,76±4,04	22,32±2,86	21,47±4,72	20,65±1,96
IP	29,69±4,66	33,48±5,07	31,10±5,22	28,82±3,38
SUB-G0G1	2,608±0,536	5,515±0,780	4,712±0,988	4,378±0,434*
BP	0,447±0,165	0,502±0,110	0,477±0,169	0,398±0,123



**Рис. 3.** Приклад ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин тимусу через 3 доби після опікової травми шкіри на тлі застосування HAES-LX 5 %. RN1 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 8,68 %.

проліферації клітин тимусу відбувається реалізація механізмів захисту від опікового ушкодження.

Через 7 діб після термічного опіку шкіри на фоні застосування 0,9 % розчину NaCl всі показники клітинного циклу клітин тимусу практично не відрізнялись від аналогічних показників групи тварин без опікового пошкодження. Однак, якщо на фоні застосування лактопротеїну з сорбітолом всі показники були ідентичними до показників групи опік + 0,9 % NaCl, то в групі опік + HAES-LX 5 % зберігалась статистично значуща менша кількість клітин з фрагментованою ДНК (SUB-G0G1) ( $p < 0,05$ ), а також спостерігались незначні тенденції до підвищення індексу проліферації ( $p = 0,078$ ) і зменшення кількості клітин в фазі G0G1 ( $p = 0,0782$ ) (табл. 4).

Виявлені нами відмінності кінетики клітинного циклу на фоні опікового ушкодження можуть вказувати на різні шляхи реалізації протекторного ефекту препаратів HAES-LX 5 % та лактопротеїну з сорбітолом на

клітини тимусу, що заслуговує подальшого вивчення механізму їх дії. Виявлена нами динаміка показників клітинного циклу та антиапоптозний ефект на фоні введення препаратів лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX 5 % через 1, 3 та 7 добу після опікового ураження шкіри вказує на доцільність їх застосування в ранні строки для корекції пошкоджень, виявлених у тимусі.

Також варто відмітити, що порушення в клітинах тимусу, на фоні опіку, які відбуваються на внутріклітинному рівні, передують розвитку патологічних змін на клітинному та тканинному рівні, що виявлено як в наших спостереженнях, так і в роботах інших дослідників [Hobson et al., 2003]. На нашу думку, можна припустити прогностичну цінність вивчення показників кінетики клітинного циклу відносно перспективи подальшого відновлення клітин тимусу на фоні опікової хвороби.

Через 14 діб після опікового ураження шкіри статистично значущих відмінностей у всіх експериментальних групах тварин між відповідними показниками клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин тимусу не виявлено (таблиця 5).

В цілому, це вказує на відновлення всіх показників клітинного циклу після опікового ушкодження саме в цей період, що може пояснюватись посиленням енергетичних потреб організму в пластичних елементах (білків, вуглеводів та ін.) необхідних для відновлення клітинної популяції та нормального функціонування тимусу.

Через 21-у та 30-у добу після термічного опіку шкіри (див. табл. 5) нами були виявлені деякі особливості впливу використаних препаратів на основні показники клітинного циклу клітин тимусу щурів. Так, через 21 добу після опіку була виявлені: виражена тенденція до

**Таблиця 5.** Показники клітинного циклу та фрагментації ДНК клітин тимусу через 14, 21 та 30 діб після опіку шкіри та на фоні корекції 0,9 % розчином NaCl, препаратами лактопротеїну з сорбітолом, або HAES-LX 5 % за даними проточної ДНК-цитометрії ( $M \pm \sigma$ ).

Групи тварин	Доба	G0G1	S	G2 + M	IP	BP	SUB-G0G1
0,9 % розчин NaCl	14	69,86±4,34	8,31±2,861	21,83±2,33	30,14±4,34	0,380±0,130	2,442±0,641
	21	70,86±1,91	8,480±1,269	20,60±1,32	29,08±2,01	0,412±0,060	2,098±0,871
	30	71,86±4,11	7,635±2,416	20,51±4,66	28,14±4,11	0,402±0,194	2,250±0,921
Опік+ 0,9 % розчин NaCl	14	75,47±8,00	6,317±2,977	18,21±5,12	24,53±8,00	0,332±0,080	3,672±0,928
	21	75,73±7,06	6,662±2,086	17,61±5,36	24,27±7,06	0,383±0,077	3,233±0,998
	30	75,73±5,56	6,642±2,195	17,63±5,45	24,27±5,56	0,442±0,278	2,428±0,736
Опік + лактопротеїн з сорбітолом	14	70,46±0,57	8,245±0,921	21,31±1,03	29,55±0,57	0,390±0,059	3,388±1,237
	21	71,76±3,29	7,367±1,488	20,88±2,27	28,25±3,29	0,352±0,062	3,085±0,693
	30	72,13±4,41	6,998±2,822	20,87±2,60	27,87±4,41	0,337±0,132	2,383±0,930
Опік + HAES-LX 5 %	14	70,44±4,67	8,840±2,550	20,72±3,51	29,56±4,67	0,435±0,143	3,013±1,178
	21	69,20±3,65*	9,097±2,150	21,70±2,44	30,80±3,65*	0,422±0,096	2,458±0,726
	30	70,74±4,49	8,195±1,453	21,07±3,17	29,27±4,49	0,390±0,032	2,520±0,684

збільшення відсотку клітин у фазі S в групі опік + HAES-LX 5 % ( $p=0,057$ ); статистично значуще зменшення клітин у фазі G0G1 та індексу проліферації в порівнянні з показниками групи опік + 0,9 % розчин NaCl. Однак, в групі опік + лактопротеїн з сорбітолом ні статистичних значущих відмінностей ні тенденцій в показниках клітинного циклу в порівнянні з аналогічними показниками групи опік + 0,9 % розчин NaCl в цей термін не зафіксовано.

На основі аналізу отриманих нами даних можемо зробити висновок про наявність більш вираженого антиапоптозного ефекту препарату HAES-LX 5 %, який зберігається навіть після припинення його введення. Особливості кінетики клітинного циклу клітин тимусу через 21 добу після термічного опіку шкіри можуть вказувати на доцільність застосування подальшої медикаментозної корекції в цей термін, що, на нашу думку, допоможе швидше відновити показники Т-клітинного імунітету й ліквідувати імунodefіцит. Слід зауважити, що за даними окремих дослідників [Hobson et al., 2002; D'Elia et al., 2005] відновлення показників клітинного циклу клітин тимусу відбувається саме в період до 21 - 22 доби. Однак, поряд з цим існує і протилежна точка зору щодо збереження Т-клітинного імунodefіциту [Тарасов, 2009] в цей же термін (21 - 22 доба) після опікового ушкодження із ознаками інфекційних ускладнень, що потребує, на наш погляд, подальшого вивчення.

### Список літератури

- Косенко В.М. Невідкладна корекція імунodefіциту як складова анестезіологічного забезпечення раннього хірургічного лікування тяжко обпечених / В.М. Носенко // Мед.-соц. проблеми семьи. - 2010. - Т. 15, № 2. - С. 61-69.
- Спиридонова Т.Г. Полиорганная дисфункция и недостаточность у обожженных: автореф. дис. д-ра мед. наук : 14.00.27, 14.00.17 / Тамара Георгиевна Спиридонова. - М., 2007. - 41 с.
- Тарасов А. Е Иммунологические аспекты ожоговой болезни в клинике и эксперименте: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук. : 14.00.36 / Тарасов Александр Евгеньевич. - Владивосток, 2009. - 20 с.
- Burn-induced thymic apoptosis corresponds with altered TGF-beta (1) and Smad 2/3 / [Hobson K.G., Cho K., Adamson L.K., Greenhalgh D.G.] // J Surg Res. - 2002. - 105. - P. 4-9.
- Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice / M. D'Elia, J. Patenaude, C. Hamelin [et al.] // Am. J. Physiol Endocrinol Metab. - 2005. - № 88. - P. 852-860.
- Demling R.H. Burns: what are the pharmacological treatment options? / R.H. Demling // Expert Opin Pharmacother. - 2008. - № 9. - P. 1895-1908.
- Kasten K.R Update on the critical care management of severe burns / K.R. Kasten, A.T. Makley, R.J. Kagan // Journal of Intensive Care Medicine. - 2011. - № 26. - P. 223-236.
- Ringer's malate solution protects against the multiple organ injury and dysfunction caused by hemorrhagic shock in rats / Dai Z.L., Wu J., Meng C. [et al.]. - Shock. - 2012. - № 38. - P. 268-74.
- Tricklebank S. Modern trends in fluid therapy for burns / S. Tricklebank // Burns. - 2009. - № 35. - P. 757-767.

*Гунас І.В., Кондрацкий Б.А., Черкасов Э.В., Черешнюк И.Л., Лысенко Д.А.*

### ПОСЛЕДСТВИЯ ВЛИЯНИЯ ОЖОГА КОЖИ НА ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА КЛЕТОК ТИМУСА И ИХ КОРРЕКЦИЯ ЛАКТОПРОТЕИНОМ С СОРБИТОЛОМ ИЛИ HAES-LX 5 %

**Резюме.** В статье представлены результаты исследования показателей кинетики клеточного цикла клеток тимуса крыс после термического ожогового повреждения кожи на фоне применения 0,9 % раствора NaCl, препаратов лактопротеина с сорбитолом или HAES-LX 5 %. Ожоговое повреждение кожи на фоне применения 0,9 % раствора NaCl приводит к нарушению клеточного цикла клеток тимуса, максимально выраженного через 1 и 3 сутки наблюдения. Применение препаратов лактопротеина с сорбитолом или HAES-LX 5 % позволяет существенно улучшить показатели клеточного цикла клеток тимуса и уменьшить негативное влияние ожогового повреждения: лактопротеина с сорбитолом за счет влияния на синтез ДНК (S-фазу), а препарата HAES-LX 5 % на апоптоз, что проявляется уменьшением фрагментации ДНК (SUB-G0G1).

**Ключевые слова:** тимус, клеточный цикл, ожог, ДНК-цитометрия, лактопротеин с сорбитолом, HAES-LX 5 %.

*Gunas I.V., Kondratskyi B.O., Cherkasov E. V., Chereshnyuk I.L., Lysenko D. A.*

### THE EFFECTS OF THE SKIN BURNING ON CELL CYCLE OF THE THYMUS CELLS AND THEIR CORRECTION BY LACTOPROTEIN WITH SORBITOL OR HAES-LX 5%

**Summary.** In the article presents the results of a study of the kinetics of cell cycle indicators thymus cells of rats after thermal burn injury of the skin on the background of treatment with 0,9% solution of NaCl, drugs Lactoprotein with Sorbitol or HAES-LX 5%. Burn injury of the skin on the background of treatment with 0,9% solution of NaCl leads to disruption of the cell cycle of the thymus cells is most highly expressed at 1 and 3 day observation. The use of Lactoprotein with Sorbitol or HAES-LX 5% can significantly improve the performance of the cell cycle of the thymus cells and reduce the negative impact of burn injury: Lactoprotein with Sorbitol affects on DNA synthesis (S-phase), and the drug HAES-LX 5% affects on apoptosis that manifests a decrease in DNA fragmentation (SUB-G0G1).

**Key words:** thymus, cell cycle, burn, DNA cytometry, Lactoprotein with Sorbitol, HAES-LX 5 %.

Стаття надійшла до редакції 17.02.2012р.

© Кисельова Т. М.

УДК: 616.36-002: 615.838

**Кисельова Т.М.**

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ АВТОІМУННИЙ ГЕПАТИТ І РЕЗУЛЬТАТ РАДОНОВОЇ ТЕРАПІЇ. СТРУКТУРНІ ПАРАЛЕЛІ

**Резюме.** Класичним і визнаним в лікуванні автоімунних гепатитів довгі роки залишається застосування імунодепресантів (зокрема глюкокортикоїдів) і різних цитостатиків. Та навіть у випадках ефективних ремісій з часом виникають важкі побічні дії, рецидиви, цироз. В перебігу автоімунних гепатитів головує лімфоцитарна автоагресія проти гепатоцитів на тлі дефіциту регуляції з боку імуносупресорів. Переймаючись цими фактами і маючи власний досвід у вивченні механізмів дії на організм такого фізіотерапевтичного фактору як радон, зокрема його властивість активізувати Т-супресорну ланку імунітету, ми вирішили дослідити ймовірність реалізації такої властивості на модельованому АІГ в експерименті. Індукцію АІГ здійснювали шляхом сенсibiliзації щурів підшкірним введенням (за схемою імунізації) комплексного печінкового антигена. Макроскопічні і морфометричні дослідження гістологічних зрізів печінки проводили в кінці декількох термінів експериментів. Двічі застосовували радонові ванни за правилами курортного курсу і в якості контролю - звичайні водні ванни. Вивчено патоморфогенез автоімунних гепатитів до кінця 5 місяця і результати радонотерапії. Встановлено поступове поглиблення дії сенсibiliзованих автоагресивних лімфоцитів з розвитком картини часточкового гепатиту й ростом некротичних процесів. Виявлено справжню біопозитивність дії радону, дійсну реалізацію розгортання його імуносупресивних потенцій з активацією регенеративних резервів печінки.

**Ключові слова:** автоімунний гепатит, лімфоцитарна автоагресія, гепатоцит, радон, альфа-терапія, імуносупресія, регенерація.

### Вступ

Головним засобом етіопатогенетичної терапії автоімунних гепатитів (АІГ) були й досі залишаються глюкокортикоїди у режимі монотерапії [Никитин, Сторожаков, 2006; Циммерман, 2010] і в комбінації з імунодепресантом азатиоприном та в інших комбінаціях з цитостатиками [Ивашкин, Буеверов, 2001]. Проте вже через декілька років лікування виявляються важкі побічні ефекти, а відміна глюкокортикоїдів обумовлює рецидив хвороби. Покращує стан хворих застосування меркаптопурина, але згодом виявляється редукція мієлопоезу.

Переймаючись цією медичною проблемою, ми вирішили привернути увагу до зовсім інших можливостей корекції патоморфогенезу АІГ, а саме до дійових потенцій такого природного фактору, як радон [Казначеев, Чернявский, 1976; Гусаров и др., 1999; Гусаров, 2000]. Це сприятливий вплив його альфа-випромінювання на загальний і регіональний кровообіг, мікроциркуляцію в тканинах і органах; нормалізуючий вплив на обмін білків, нуклеїнових кислот, ліпідів, макро-і мікроелементів [Бокша, 1983; Конопляников, 1994; Гусаров и др., 1999]. Це активація гіпоталамо-гіпофізарно-наднирничкової системи [Соловьева и др., 2008] і гормо-

нальної функції статевих залоз [Донских, Бычкова, 1980; Соловьева, 1996]. Застосування радону як лікувального фактору у курортній практиці отримало назву альфа-терапії [Конопляников, 1994; Гусаров и др., 1999; Гусаров, 2000].

Це й десенсибілізуючий ефект, сприяння нормалізації функціональної активності та взаємодії Т- і В- систем імунітету, гальмування автоімунних процесів в організмі, зростання рівня його неспецифічної резистентності [Соловьева и др., 2005; Кисельова та ін., 2007].

А також це розвиток в клітинах внутрішніх органів і органів імунної та ендокринної систем таких багатопланових морфологічних змін продуктивного характеру, котрі формують основу для вищого рівня метаболічних процесів і за своєю сутністю відповідають сформованому стану неспецифічної довготривалої адаптації резистентного типу [Соловьева и др., 2008]. Це, нарешті, морфологічні маніфестації настання в тимусі, в селезінці та лімфатичних вузлах абсолютного переважання клітинної ланки імунітету [Соловьева, 1996; Соловьева, 1996; Соловьева и др., 2005; Соловьева и др., 2008]. Саме на ефект посилення загальної резистентності організму і підвищення функціональної повноцінності