
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616-001.17:599.323.4:591.22:576.36

**КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК
КЛЕТОК ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ**

*И.В. ГУНАС¹, А.А. ОЧЕРЕТНЮК¹, И.Л. ЧЕРЕШНЮК¹, Д.А. ЛЫСЕНКО¹,
М.В. МНИХОВИЧ²*

Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
г. Винница (1)
ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, г. Москва (2)

**THE CELL CYCLE, DNA FRAGMENTATION CELLS THE LUNGS
OF RATS DURING BURN DISEASE**

*I.V. GUNAS¹, A.A. OCHERETNJUK¹, I.L. CHERESHNJUK¹, D.A. LYSENKO¹,
M.V. MNIHOVICH²*

Vinnitsa national medical University named after N.I. Pirogov, Vinnitsa (1)
NII of human morphology" of the RAMS, Moscow (2)

Представлены результаты исследования показателей кинетики клеточного цикла клеток легких крыс, определяемых методом проточной ДНК-цитометрии, после термического ожогового повреждения кожи и применения 0,9 % раствора NaCl через 1, 3 и 7 суток. Показатели клеточного цикла клеток легких у крыс без ожогового повреждения характеризовались значительным преобладанием клеток, находящихся в фазе G0G1, и наличием баланса между процессами синтеза (S-фаза) и апоптоза (интервал SUB-G0G1). Через 1 сутки после ожогового поражения преобладали процессы апоптоза (увеличение клеток в интервале SUB-G0G1) при сохраненной способности клеток к синтезу ДНК (S-фаза). При этом отмечалось увеличение доли кле-

ток, находящихся в фазе G0G1, наряду с увеличением блока пролиферации и снижением индекса пролиферации за счет уменьшения количества клеток в фазе G2 + M. При дальнейшем развитии ожогового поражения (3 суток после ожога) зафиксировано уменьшение популяции клеток в фазе G0G1 и увеличение индекса пролиферации. Через 3 и 7 суток эксперимента сохранялись значительное количество клеток с фрагментированной ДНК и увеличенные показатели блока пролиферации. На фоне ожогового поражения через 3 и 7 суток наблюдалось увеличение показателя S-фазы в сравнении с аналогичными показателями группы животных без ожога.

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

The topic presents the results of the study of lung cell cycle kinetics parameters in rats, determined by method of flow DNA-cytometry with underlying thermal burn injuries to the skin and administration of 0,9 % NaCl solution on 1st, 3nd and 7th days after injury. It was found that the parameters of lung cell cycle in rats with no significant burn injuries were characterized by a predominance of G0G1 cells and the balance between the processes of synthesis (S-phase) and apoptosis (SUB-G0G1 interval). The apoptosis (increase in number of cells within SUB-G0G1 interval) while maintaining the ability of cells to DNA synthesis (S-phase) dominated within a day after burn injuries. At the same time, a number of G0G1 cells also increased, along with an increase of proliferative unit and decrease of proliferation index, on account of reduction in number of G2 + M cells. We noticed a decrease in G0G1 cell population and increase of proliferation index under further development of burn injury within 3 days after registration of burns. A significant number of cells with fragmented DNA and increased parameters of proliferation unit remained on 3 and 7 day of the experiment. Also, we observed an increased S-phase index in animals with burn injuries 3 and 7 days after actual burns compared with the same index in animals with no burns.

Key words: lung, cell cycle, burn, flow DNA-cytometry.

Введение

Общеизвестно, что поражение легких является достаточно частым осложнением вследствие термических ожогов тела, как в ранний, так и в поздний послеожоговый период, которое зачастую существенно усугубляет состояние больных, часто явля-

ется причиной смерти больного и требует интенсификации и модификации способов лечения [2]. Основной формой клинической патологии легких при ожоговой болезни является пневмония. Многие авторы считают пневмонию главной причиной смерти обожженных, указывая на то, что по-

ражение легких становится главной причиной летальных исходов в первом периоде ожоговой болезни [5]. По данным литературы осложнения со стороны легких и дыхательных путей при глубоких ожогах наблюдались в 38,5 % случаев, а некоторые исследователи приводят большие цифры – до 60 %, а расхождение этих данных, очевидно, обусловлено отсутствием четких критериев диагностики поражений легких на фоне ожогов [1].

Анализ клинической картины поражения легких на фоне ожогов указывает на разнообразие ее форм, но чаще выделяют две его основные разновидности. Первая из них связана с действием высоких температур на слизистую оболочку дыхательных путей. Эта форма воспаления легких некоторыми авторами выделяется термином «первичная ожоговая пневмония». Вторая форма – вторичные послеожоговые пневмонии – возникает вне непосредственной связи с действием термического агента на респираторный тракт. Именно ее патогенез развития и клеточные механизмы поражения являются наименее изученными, что, в свою очередь, не позволяет разработать адекватные и достаточно эффективные способы лечения данной патологии [3].

Немногочисленные исследования, посвященные клеточным основам поражения легких на фоне ожогов, описывают изменения клеточного

цикла при прямом воздействии термического фактора на клетки легких [6, 7]. Установлено, что индекс апоптоза увеличивается уже через 2 часа после ожога и продолжает оставаться высоким в последующее время, а индекс PCNA увеличивается через 12 часов после ожога и, достигнув наибольших значений на 3 день после ожога, остается на высоком уровне в более позднем периоде. По мнению некоторых исследователей апоптоз не только играет роль повреждения при ожогах, но и является важным фактором в защите и восстановлении легочной ткани в более поздний период [8]. В литературе нам не удалось обнаружить данных об исследовании показателей клеточного цикла клеток легких на фоне термического ожога, что и обусловило цель нашего исследования.

Цель исследования

Методом проточной ДНК-цитометрии определить показатели клеточного цикла и фрагментации ДНК клеток легких в ранний послеожоговый период (через 1, 3 и 7 суток) после термического ожога кожи.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование динамики показателей клеточного цикла и фрагментации ДНК клеток легких после ожоговой травмы кожи (через 1, 3 и 7 суток) на фоне применения 0,9 % раствора NaCl (физиоло-

гический раствор, ФР) было выполнено на 36 крысах-самцах линии Вистар массой 155-160 грамм на базе Винницкого национального медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Содержание и манипуляции с животными проводились согласно «Общим этическим принципам экспериментов на животных», принятым на Первом национальном конгрессе по биоэтике (Киев, 2001), рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и положениям «Правил доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». Животные были разделены на 2 группы: I – крысы без термической травмы кожи, которым проводилась инфузия ФР; II – животные с ожогом кожи, которым также проводилась инфузия ФР.

Ожог после соответствующей премедикации вызывали путем прикладывания к боковым поверхностям туловища животных четырех медных пластинок (по 2 пластинки с каждой стороны), которые предварительно держали 6 мин в воде с постоянной температурой 100 °С. Общая площадь ожога у крыс указанной массы составляла 21-23 % при экспозиции 10 сек, что является достаточным для формирования ожога II степени – дермального поверхностного ожога с

развитием шокового состояния средней степени тяжести.

ФР вводили внутривенно на протяжении 5-6 мин. в дозе 10 мл/кг массы тела. Инфузию производили в нижнюю полую вену, для чего выполняли ее катетеризацию в асептических условиях через бедренную вену. Катетер, установленный в бедренной вене, подшивали под кожу. Его просвет по всей длине заполняли титрованным раствором гепарина (0,1 мл гепарина на 10 мл ФР) после каждого введения ФР. Первое введение ФР осуществляли через 1 час после моделирования патологического состояния, последующие инфузии выполняли ежедневно на протяжении 7 суток. Забор материала проводили под наркозом. У животных после декаптации разрезали грудную полость и вырезали лезвием кусочки легких размером около 1 см³.

Содержание ДНК в ядрах клеток легких определяли методом проточной цитометрии. Суспензии ядер клеток легких получали с помощью раствора для исследования ядерной ДНК CyStain DNA (Partec, Германия) соответственно протоколу-инструкции производителя. Данный раствор позволяет быстро и одновременно выполнять экстракцию ядер и помечать ядерную ДНК диаминофенилиндолом (сокр. англ. DAPI), который входит в его состав.

В процессе изготовления ядерных суспензий использовали одноразовые фильтры CellTics 50 мкм (Partec, Германия).

Проточный анализ выполняли на многофункциональном проточном цитометре "Partec Pas" (Partec, Германия) в Научно-исследовательском центре Винницкого национального университета имени Н.И. Пирогова.

Для возбуждения флуоресценции DAPI использовали УФ-излучение. Из каждого образца ядерной суспензии анализировалось 20 тыс. событий.

Распределение ДНК, которое отображает клеточный цикл и фрагментацию ДНК, представлено на странице с одной гистограммой с использованием линейной шкалы.

Анализ клеточного цикла производили средствами программного обеспечения FloMax (Partec, Германия). Цифровой результат показан в окне циклического анализа клеток по алгоритму клеточного цикла вместе с графическим представлением фаз G0G1, S, G2 + M и экспериментальными данными.

Количественные показатели клеточного цикла:

G0G1 – процент клеток в фазе G0G1 по отношению к клеткам во всех фазах клеточного цикла. На ДНК-гистограммах участок G0G1 обозначен как G1% и указывает долю ядер клеток с содержанием ДНК = 2с.

S – процент клеток в фазе синтеза ДНК по отношению к клеткам во

всех фазах клеточного цикла. На ДНК-гистограммах показатель S обозначен как S% и указывает долю клеток с содержанием ДНК > 2с и < 4с.

G2 + M – процент клеток в фазе G2 + M по отношению к клеткам во всех фазах клеточного цикла. На ДНК-гистограммах показатель G2 + M обозначен как G2M% и указывает долю клеток, в которых происходит подготовка к делению (ДНК = 4с).

Определение фрагментации ДНК выполнено программными средствами FloMax (Partec, Германия) путем выделения SUB-G0G1 участка на ДНК гистограммах – RN1 перед пиком G0G1, который соответствует ядрам клеток с содержанием ДНК < 2с и указывает процент ядер клеток в состоянии апоптоза.

IP – показатель пролиферации (пролиферативный индекс), который определяется по сумме показателей S + G2 + M.

BP – блок пролиферации. Увеличение числа клеток в фазе G2 + M при низких значениях S – фазы свидетельствует о задержке (блоке пролиферации) клеточного цикла в стадии G2 + M. Этот показатель оценивается по соотношению: $S / (G2+M)$.

Статистическая обработка полученных результатов была проведена в пакете "STATISTICA 6,1" с применением непараметрических методов. Оценивали правильность распределения признаков по каждому из полу-

ченных вариационных рядов, средние значения каждого признака и его стандартное квадратичное отклонение. Достоверность различий значений между независимыми количественными величинами определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют об отсутствии достоверных различий в показателях клеточного цикла клеток легких у животных контрольной группы (без ожогового поражения на фоне введения ФР) через 1, 3 и 7 суток после начала эксперимента (таблица 1). Большинство клеток (около 80 %) в легких животных контрольной группы находилась в фазе G0G1, а сопоставимое количество клеток в фазе S и интервале SUB-G0G1 дает основание предположить существование определенного баланса между процессами синтеза и фрагментации ядерной ДНК в неповрежденной легочной ткани.

В отличие от показателей клеточного цикла клеток легких животных группы контроля, на фоне ожога и применения ФР уже через 1 сутки исследования были обнаружены существенные изменения, которые заключались в значительном увеличении доли клеток, находящихся в фазе G0G1 ($p < 0,01$), а также клеток с фрагментированной ДНК (интервал SUB-G0G1) ($p < 0,01$) на фоне уменьшения доли

клеток в фазе G2 + M ($p < 0,01$). При этом показатели S-фазы клеток легких группы животных через 1 сутки после ожога не отличались от показателей контрольной группы. Соответственно, были выявлены существенное уменьшение индекса пролиферации IP ($p < 0,01$) и нарастание блока пролиферации BP ($p < 0,05$) через 1 сутки после ожогового поражения по сравнению с показателями контрольной группы. На рис. 2 представлен пример ДНК-гистограммы суспензии ядер клеток легких крысы через 1 сутки после ожога кожи на фоне применения ФР.

На рисунке 1 представлен пример ДНК-гистограммы суспензии ядер клеток легких крысы без ожогового повреждения на фоне применения ФР.

Через 3 суток после ожогового поражения кожи и применения ФР сохранялось уменьшение количества клеток в фазе G2 + M ($p < 0,05$), наряду с повышенным содержанием в легочной ткани клеток SUB-G0G1 ($p < 0,01$). При этом также сохранялся увеличенным показатель BP ($p < 0,01$) по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы в соответствующий период. Через 3 суток после ожогового поражения, в отличие от показателей клеточного цикла клеток легких через 1 сутки после ожога, наблюдалось существенное уменьшение популяции клеток G0G1 и увеличение индекса пролиферации, которые, однако, не имели достоверных отличий от показателей контрольной группы

Показатели клеточного цикла клеток легких и фрагментации ДНК на фоне действия ожогового повреждения кожи и коррекции 0,9 % раствором NaCl ($M \pm \sigma$)

Сутки	Группы животных	Показатели клеточного цикла					
		G0G1	S	G2 + M	IP	SUB-G0G1	BP
1	0,9 % p-p NaCl	80,09 ±3,69	3,33 ±0,99	16,58 ±2,93	19,91 ±3,69	4,49 ±1,44	0,20 ±0,04
	Ожог + 0,9 % p-p NaCl	92,14 ±4,13 #	2,54 ±1,66	5,32 ±2,50 #	7,86 ±4,14 #	16,21 ±5,08 #	0,44 ±0,11 #
3	0,9 % p-p NaCl	81,26 ±2,31	2,66 ±1,09	16,08 ±2,51	18,74 ±2,31	3,77 ±1,03	0,17 ±0,08
	Ожог + 0,9 % p-p NaCl	85,54 ±6,44 *	4,59 ±2,31	9,87 ±4,13 #*	14,46 ±6,44 *	16,61 ±5,42 #	0,44 ±0,07 #
7	0,9 % p-p NaCl	81,12 ±3,46	3,04 ±1,01	15,85 ±2,97	18,89 ±3,45	4,05 ±0,99	0,20 ±0,07
	Ожог + 0,9 % p-p NaCl	81,81 ±5,22 *	4,95 ±1,19 #*	13,24 ±4,61 *	18,19 ±5,22 *	13,72 ±5,56 #	0,40 ±0,11 #

Примечание. # – статистически значимые различия с показателями соответствующей группы животных без ожога; * – статистически значимые различия с показателями группы животных через 1 сутки после ожога кожи.

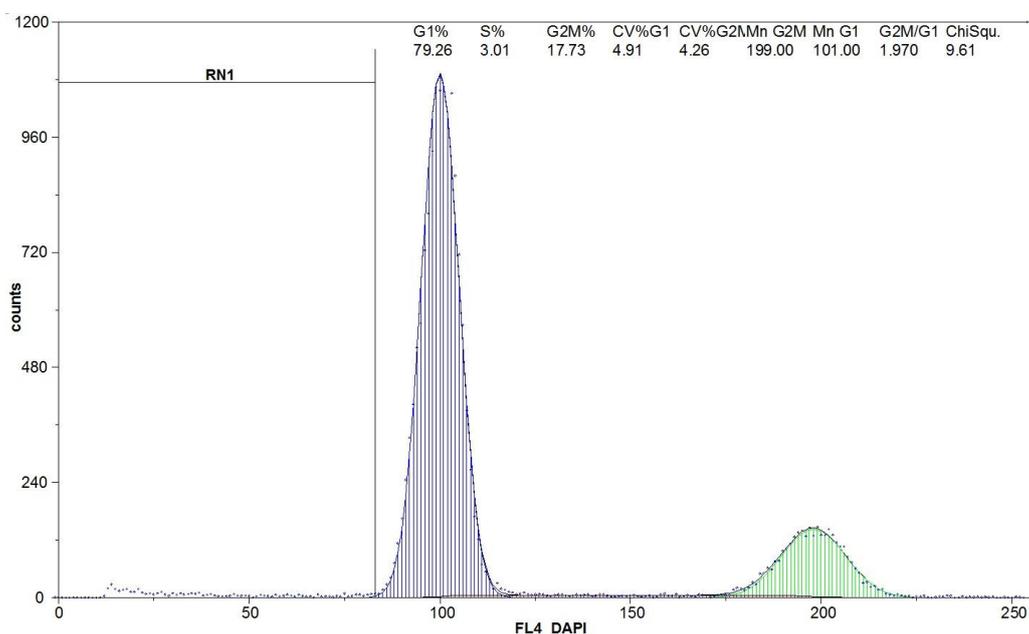


Рис. 1. ДНК-гистограмма ядерной суспензии клеток легких крысы без ожога кожи через 1 сутки после применения 0,9 % раствора NaCl. RN1 (SUB-G0G1, фрагментация ДНК) = 2,83 %

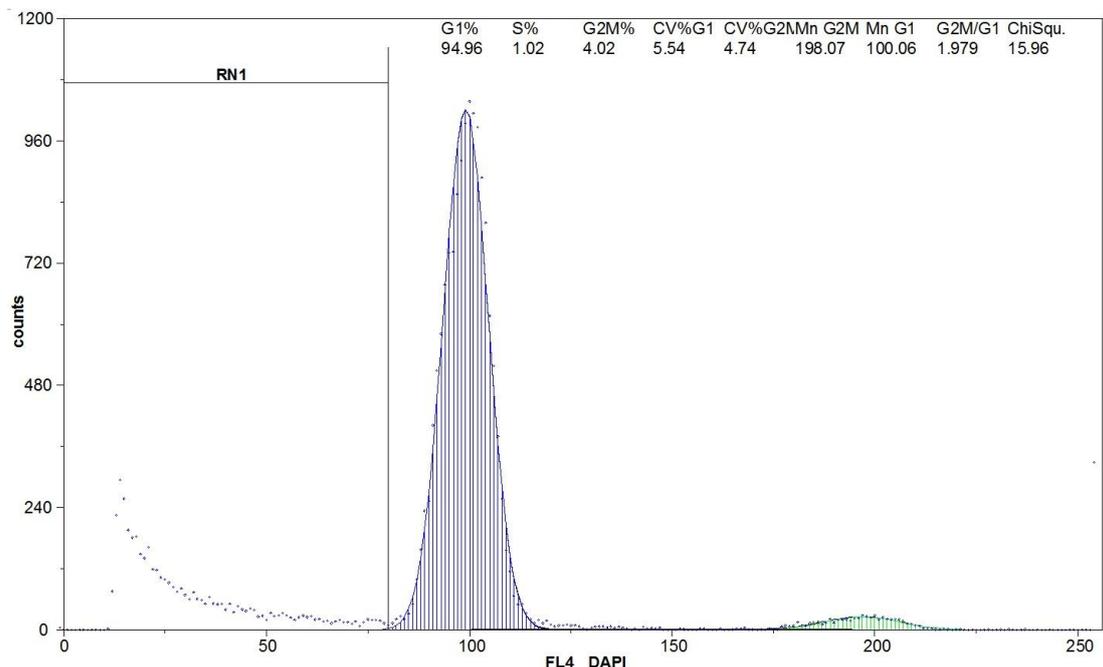


Рис. 2. ДНК-гистограмма ядерной суспензии клеток легких крысы через 1 сутки после ожога на фоне применения 0,9 % раствора NaCl. RN1 (SUB-G0G1, фрагментация ДНК) = 21,54 %

($p > 0,05$). Сравнение показателей клеточного цикла клеток легких группы животных с ожоговым поражением через 1 и 3 суток показало, что на фоне снижения доли клеток фазы G0G1 и увеличения доли клеток фазы G2 + M существенно возрос индекс пролиферации (IP) ($p < 0,05$).

Через 7 суток в группе после ожогового поражения и применения ФР зафиксировано дальнейшее уменьшение числа клеток в фазе G0G1, увеличение популяции клеток, находящихся в фазе G2+M и, соответственно, увеличение индекса пролиферации. При этом данные показатели клеточного цикла клеток легких не отличались от аналогичных показателей контрольной груп-

пы через 7 суток эксперимента ($p > 0,05$). Однако, вместе с тем, сохранялось значительное увеличение доли клеток с фрагментированной ДНК (SUB-G0G1) ($p < 0,05$) и показателя блока пролиферации ($p < 0,05$) в сравнении с аналогичными показателями группы контроля. Достаточно неожиданным оказалось увеличение показателя S-фазы через 7 суток после ожогового поражения по сравнению с этим же показателем, определенным в контрольной группе ($p < 0,05$) и в группе животных через 1 сутки после ожогового повреждения кожи ($p < 0,05$).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о достаточно стабильной картине показателей кле-

точного цикла в клетках легких животных без ожоговой травмы с преобладанием, с одной стороны, клеток, находящихся в фазе G0G1, и наличием определенного баланса между процессами синтеза ядерной ДНК и апоптоза. На фоне ожогового поражения через 1 сутки в клетках легких преобладают процессы апоптоза, о чем свидетельствует существенное увеличение клеточной популяции с фрагментированной ДНК при сохранении доли клеток, синтезирующих ДНК. Наряду с этим через 1 сутки после ожога происходит увеличение доли клеток, находящихся в фазе G0G1, и блока пролиферации, а также снижение индекса пролиферации за счет уменьшения числа клеток в фазе G2 + M. Не отрицая вероятности прямого воздействия токсинов как основного медиатора клеточных нарушений при ожогах, можем отметить, что в данном случае возможна и параллельная защитная реакция организма на ожог путем снижения активной части пролиферирующих клеток и сохранения их популяции. Подобный механизм встречается при других видах поражения, например, радиационном, и позволяет сохранить основную массу клеток неповрежденной [4].

При дальнейшем развитии ожогового поражения уже через 3 суток происходят изменения в сторону нормализации показателей клеточного цикла, что проявляется в виде уменьшения доли клеток в фазе G0G1 и уве-

личения индекса пролиферации. Можно предположить, что некоторое восстановление показателей клеточного цикла клеток легких через 3 суток после ожога возникает еще до проявления гистологических признаков регенерации, которые, по данным литературы, выявляются позднее [6]. На фоне ожогового поражения (через 3 и 7 суток) сохраняется значительное количество клеток в состоянии апоптоза и наблюдается увеличение блока пролиферации, что может указывать на недостаточность компенсаторных возможностей организма к восстановлению. Несмотря на существование взглядов о защитной роли апоптоза после ожогового поражения, сопоставление клинических данных других исследователей и полученных нами позволяет сделать заключение, что поражение легких может происходить именно на фоне усиления процессов апоптоза. Об этом может свидетельствовать увеличение и показателя S-фазы, выявленное через 7 суток после ожогового поражения, что, в свою очередь, указывает на недостаточные процессы репарации клеток легких в ранний период течения ожогового поражения.

Выводы

1. В легких крыс без ожоговой травмы на фоне применения 0,9 % раствора NaCl наибольшая часть клеток легких (около 80 %), находится в фазе G0G1, а сопоставимое количество кле-

ток в S-фазе и интервале SUB-G0G1 свидетельствует о существовании определенного баланса между процессами синтеза и фрагментации ядерной ДНК в неповрежденной легочной ткани.

2. У крыс с ожоговым поражением кожи через 1 сутки в клетках легких усиливаются процессы апоптоза при сохраненном показателе S-фазы, возрастает доля клеток в фазе G0G1 наряду с увеличением блока пролиферации и снижением индекса пролиферации за счет уменьшения популяции клеток в G2+M фазе.

3. Через 3 суток после ожогового поражения проявляются признаки нормализации показателей клеточного цикла в виде уменьшения доли клеток в фазе G0G1 и увеличения индекса пролиферации. Сохраняются значительное число клеток, находящихся в состоянии апоптоза, и увеличенные показатели блока пролиферации, что наблюдается и через 7 суток эксперимента.

4. Существенное увеличение показателя S-фазы через 7 суток на фоне ожогового поражения, превышающее этот показатель у животных контрольной группы и через 1 сутки после ожога, может свидетельствовать об активации синтеза ДНК в клетках легких и их пролиферации.

Литература

1. Климов А.Г. Искусственное поддержание газообмена у пострадавших с термической травмой в пе-

риод ожогового шока: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А.Г. Климов. – СПб, 2008. – 44 с.

2. Комбустіологія: Підручник / Е.Я. Фісталь [та ін.]. – Київ: «Інтерлінк», 2004. – С. 24-26.

3. Лечение поражения дыхательных путей у пострадавших с комбинированной термической травмой: учеб. пособие / НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. – СПб, 2003. – 12 с.

4. Погорелов В.М. Морфология апоптоза при нормальном и патологическом гемопоэзе / В.М. Погорелов, Г.И. Козинец // Гематология и трансфузиология. – 1995. – № 5. – С. 17-24.

5. Поражение дыхательных путей у обожжённых / С.К. Боечко [и др.]. – Киев, 1990. – С. 96-118.

6. Effects of smoke inhalation injury on the phagocytic function of rat alveolar macrophage and on neutrophil apoptosis / W.J. Li [et al.] // Zhonghua Shao Shang Za Zhi. – 2003. – Vol. 19, № 3. – P. 163-166.

7. The change in apoptosis and proliferation of pulmonary tissue cells in rats with smoke inhalation injury / W. Li [et al.] // Zhonghua Shao Shang Za Zhi. – 2002. – Vol. 18, № 3. – P. 139-141.

8. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review / V. Galani [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 2010. – Vol. 206, № 3. – P. 145-150.

Сведения об авторах

Гунас Игорь Валериевич – д-р мед. наук, проф., зав. научно-исследовательского центра Винницкого национального медицинского университета имени Н.И. Пирогова.

Украина, 21018, г. Винница, ул. Пирогова, 56. НИЦ Винницкого национального медицинского университета имени Н.И. Пирогова.

E-mail: gunas@vsmu.vinnica.ua.

Очеретнюк Анна Александровна – ассист. кафедры фармацевтической химии Винницкого национального медицинского университета имени Н.И. Пирогова.

Черешнюк Игорь Леонидович – канд. мед. наук, науч. сотрудник научно-исследовательского центра Винницкого национального медицинского университета имени Н.И. Пирогова.

Лысенко Дмитрий Андреевич – канд. мед. наук, доцент, доц. кафедры внутренних болезней №2 Винницкого национального медицинского университета имени Н.И. Пирогова.

Мнихович Максим Валерьевич – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории Научно-исследовательского института морфологии человека РАМН, г. Москва.

E-mail: mnichmaxim@yandex.ru.