

---

**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. ГУНАС<sup>1</sup>, А.А. ОЧЕРЕТНЮК<sup>1</sup>, И.Л. ЧЕРЕШНЮК<sup>1</sup>, Д.А. ЛЫСЕНКО<sup>1</sup>,  
М.В. МНИХОВИЧ<sup>2</sup>*

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. GUNAS<sup>1</sup>, A.A. OCHERETNJUK<sup>1</sup>, I.L. CHERESHNJUK<sup>1</sup>, D.A. LYSENKO<sup>1</sup>,  
M.V. MNIHOVICH<sup>2</sup>*

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 1<sup>st</sup>, 3<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> 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 см<sup>3</sup>.

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<br>±3,69              | 3,33<br>±0,99    | 16,58<br>±2,93   | 19,91<br>±3,69   | 4,49<br>±1,44    | 0,20<br>±0,04   |
|       | Ожог +<br>0,9 % p-p NaCl | 92,14<br>±4,13 #            | 2,54<br>±1,66    | 5,32<br>±2,50 #  | 7,86<br>±4,14 #  | 16,21<br>±5,08 # | 0,44<br>±0,11 # |
| 3     | 0,9 % p-p NaCl           | 81,26<br>±2,31              | 2,66<br>±1,09    | 16,08<br>±2,51   | 18,74<br>±2,31   | 3,77<br>±1,03    | 0,17<br>±0,08   |
|       | Ожог +<br>0,9 % p-p NaCl | 85,54<br>±6,44 *            | 4,59<br>±2,31    | 9,87<br>±4,13 #* | 14,46<br>±6,44 * | 16,61<br>±5,42 # | 0,44<br>±0,07 # |
| 7     | 0,9 % p-p NaCl           | 81,12<br>±3,46              | 3,04<br>±1,01    | 15,85<br>±2,97   | 18,89<br>±3,45   | 4,05<br>±0,99    | 0,20<br>±0,07   |
|       | Ожог +<br>0,9 % p-p NaCl | 81,81<br>±5,22 *            | 4,95<br>±1,19 #* | 13,24<br>±4,61 * | 18,19<br>±5,22 * | 13,72<br>±5,56 # | 0,40<br>±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.

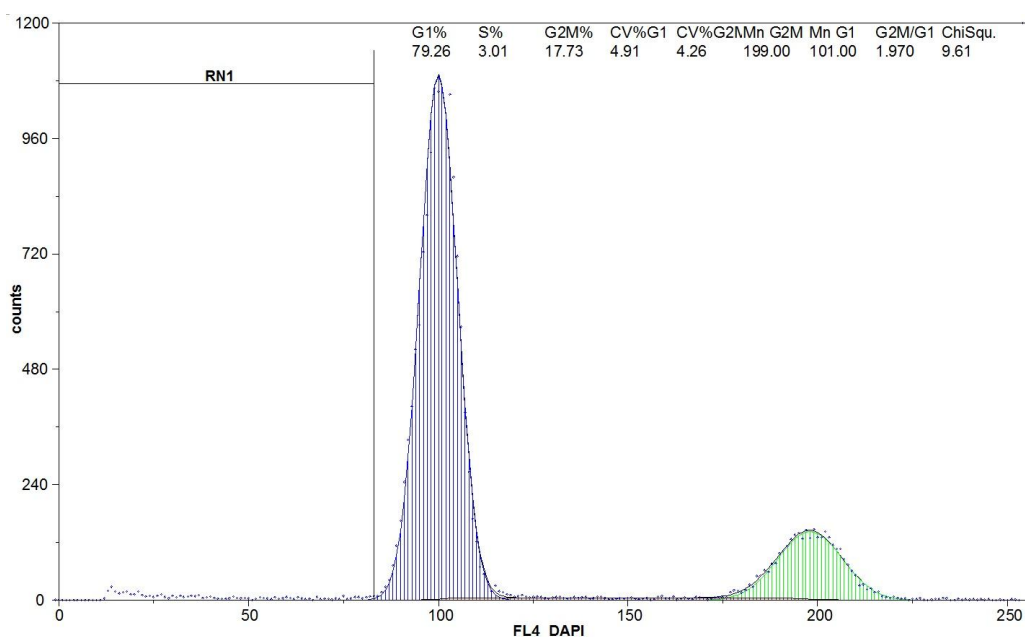


Рис. 1. ДНК-гистограмма ядерной суспензии клеток легких крысы без ожога кожи через 1 сутки после применения 0,9 % раствора NaCl. RN1 (SUB-G0G1, фрагментация ДНК) = 2,83 %

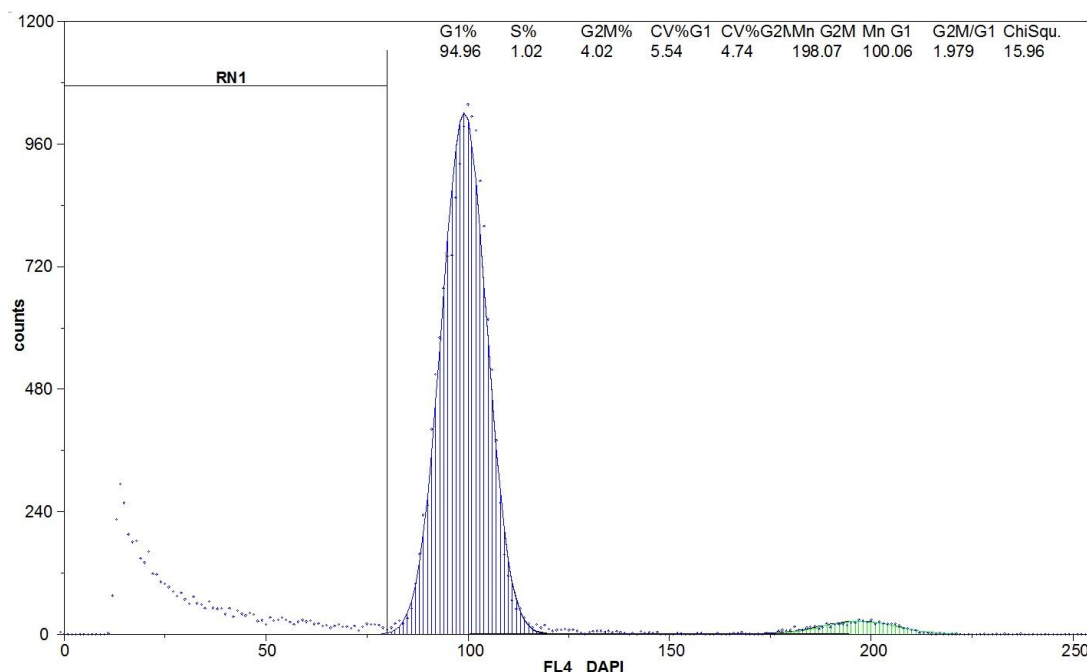


Рис. 2. ДНК-гистограмма ядерной суспензии клеток легких крысы через 1 сутки после ожога на фоне применения 0,9 % раствора NaCl. RN1 (SUB-G0G1, фрагментация ДНК) = 21,54 %

( $p > 0,05$ ). 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. Боенко [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.