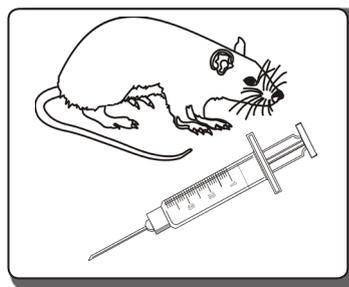


Теоретическая и экспериментальная медицина



УДК 617.58:616.13-004.6-074:616.15

Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, В.А. Арапова, С.В. Якимов

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПЕРИТОНИТА

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,
660077, ул. Партизана Железняка, 1, г. Красноярск*

Резюме

Проведено изучение активности хемилюминесцентной реакции нейтрофилов крови при моделируемом перитоните у крыс. Экспериментальная работа выполнена на половозрелых крысах линии «Wistar». Животные были разделены на две группы: 1 – контрольная группа (n=20); 2 – экспериментальная группа (n=20), с моделированным перитонитом. Для регистрации скорости образования активных форм кислорода в крови животных использовался метод люминол и люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Полученные результаты обработаны статистически. По результатам проведенного экспериментального исследования на модели перитонита у крыс зарегистрировано увеличение активности хемилюминесцентной реакции, возрастала площадь под кривой и удлинялось время выхода на пик реакции. Таким образом, происходит активация процессов кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови у крыс, что характеризует процессы, как гипероксический тип генерации активных форм кислорода.

Ключевые слова: перитонит, хемилюминесцентная реакция, моделирование перитонита у крыс.

Yu.S. Vinnik, S.S. Dunaevskaya, V.A. Arapova, S.V. Yakimov

STUDY OF ACTIVITY OF CHEMILUMINESCENT REACTION OF NEUTROPHILS OF BLOOD IN RATS IN THE MODEL OF PERITONITIS

Krasnoyarsk State Medical University, named after prof. V. F. Voyno-Yasenetsky of the Russian Ministry of Health, Krasnoyarsk

Summary

Study of activity of chemiluminescent reaction of neutrophils of blood in the modeled peritonitis in rats was carried out. The experimental work was performed on pubertal rats of «Wistar» breed. Animals were divided into two groups: 1 – control group (n=20); 2 – the experimental group (n=20), with the simulated peritonitis. To register the velocity of oxygen active forms formation in blood of animals the method of luminol and a lucigenin-dependent chemiluminescence was used. The received results were processed statistically. The results of the conducted pilot research on peritonitis model in rats, increase in activity of chemiluminescent reaction was observed, the area under a curve increased and time of an exit to reaction peak was extended. Thus, there was an activation of processes oxygen - dependent metabolism of neutrophils of blood in rats that characterized the processes as hyperoxic type of regeneration of oxygen active forms.

Key words: peritonitis, chemiluminescent reaction, model of peritonitis in rats.

Актуальность проблемы перитонита не ослабевает в связи с сохраняющимися высокими цифрами летальности, которая при тяжелых формах достигает 90 %. Основной причиной летальных исходов является развитие абдоминального сепсиса, который формируется на фоне системной воспалительной реакции и прогрессировании полиорганной недостаточности. Патогенез развития воспалительного ответа основан на активации медиаторов воспалительной реакции, про-

грессировании свободнорадикальных процессов и эндотелиальной недостаточности [3, 6, 8].

Поэтому актуальным направлением является изучение активности гранулоцитарных клеток в процессах формирования и прогрессирования воспалительной реакции [1, 7]. Особое место занимает метод хемилюминесценции, позволяющий оценить функциональную активность клеток крови. Оценивая тип генерации активных форм кислорода, продуцируемых

гранулоцитарно-макрофагальными клетками, можно прогнозировать тяжесть воспалительного процесса [2, 5, 9].

Материалы и методы

Экспериментальная работа выполнена на половозрелых крысах линии «Wistar», средняя масса составила $200,0 \pm 45,0$ г. Исследование выполнено согласно принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

Работа выполнялась на здоровых животных, без внешних признаков заболеваний, предварительно подвергшихся карантинному режиму. Крысы содержались в виварии в стандартных условиях. Животные были разделены на две группы: 1 – контрольная группа ($n=20$); 2 – экспериментальная группа ($n=20$).

В контрольную группу вошли животные без моделирования перитонита, в экспериментальной группе всем животным проводилось моделирование перитонита. Моделирование перитонита осуществляли следующим образом: производили обработку операционного поля, предварительно проведя сухое бритье передней брюшной стенки. Животным после проведения лапаротомии, выводили из брюшной полости купол слепой кишки. Некроз слепой кишки осуществляли путем наложения лигатуры, одновременно вводили 2 мл свежей отфильтрованной каловой аутовзвеси в просвет слепой кишки. Взвесь получали путем смешивания 0,5 мл стерильного изотонического раствора NaCl и 0,25 граммов кала интактных животных, полученного путем фильтрации ее через двойной слой марли. Вводили аутовзвесь не позднее чем через 10 минут после ее приготовления. Введенное количество каловой взвеси являлось достаточным для развития гнойного разлитого перитонита. Операционную рану послойно ушивали.

Оперативное вмешательство и все манипуляции проводились животным под общим обезболиванием. Эвтаназию осуществляли путем передозировки средств для наркоза в соответствии с п. 8 «Правил

Цель исследования – изучение активности хемиллюминесцентной реакции нейтрофилов крови при моделируемом перитоните у крыс.

гуманного обращения с лабораторными животными». В качестве средства для наркоза использовали хлоралгидрат 300 мг/кг внутривентриально.

Для регистрации скорости образования АФК использовался метод люминола и люцигенин-зависимой хемиллюминесценции, основанный на фиксации потока фотонов, образующихся при окислении химического активатора реакции – люминола или люцигенина.

Выделение нейтрофилов проводили одномоментным центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина. Остаточные эритроциты удаляли с помощью осмотического шока. Жизнеспособность суспензии нейтрофилов в тесте с трепановым синим была не менее 97 %.

Для проведения хемиллюминесцентного анализа в кювету вносили 100 мкл суспензии исследуемых клеток (1×10^6 кл./мл), 200 мкл $2,2 \times 10^{-4}$ М люминола (Sigma) или люцигенина (Sigma-Aldrich) в растворе Хенкса ($pH=7,4$). Для индукции фагоцитоза добавляли 50 мкл взвеси частиц монодисперсного латекса (2,3 мкм, 5×10^8 частиц/мл, ВНИИСК, С.-Петербург), опсонизированных белками сыворотки крови человека. Образование АФК регистрировали в течение 90 мин. при температуре $+37^\circ C$ на аппаратно-программном комплексе «Хемиллюминетр CL-3604-ПЭВМ» [4].

Анализировали следующие показатели: S – площадь под кривой, I max-интенсивность реакции, Tmax- время достижения I max.

Полученные результаты обрабатывались с помощью стандартных статистических программ Microsoft Office Excel 2007. Для всех показателей определяли средние значения (M), а также стандартное отклонение (s). Для оценки степени достоверности различий между группами использовали простой критерий Стьюдента (t). Различия между показателями считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Величина максимальной активности хемиллюминесцентной реакции клеток крови (I_{max} , имп./с) у крыс с моделированным перитонитом при спонтанной реакции статистически достоверно не отличалась между контрольной и экспериментальной группами. Данный показатель при активации реакции люминолом превышал уровень в экспериментальной группе в сравнении с контрольной в 6,7 раза. Значение площади под кривой при спонтанной реакции достоверно не отличался в группах. Однако, при активированной реакции показатель возрос в 8,2 раза в экспериментальной группе животных. Время выхода на пик реакции увеличивался в группе животных с экспериментальным перитонитом: при спонтанной реакции в 1,6 раза и при активированной в 11,2 раза (таблица).

Таблица

Значения параметров хемиллюминесцентной реакции гранулоцитарно-макрофагальными клетками крови у крыс

№ серии	Активатор реакции	I_{max} , имп. сек.	S, млн. имп.	T_{max} , мин.
Контрольная группа	люминол акт.	190,13±17,23	0,69±0,03	6,71±2,51
	люминол спон.	232,63±89,56	0,84±0,25	54,58±4,82
	люцигенин акт.	278,24±102,41	1,03±0,34	19,34±6,74
	люцигенин спонт.	158,34±31,12	0,54±0,14	18,23±1,25
Экспериментальная группа	люминол акт.	1276,87±69,23*	5,67±0,23*	75,01±9,50*
	люминол спон.	239,30±98,08	1,06±0,34	87,27±4,34*
	люцигенин акт.	479,18±25,55*	2,36±0,66*	55,31±15,70*
	люцигенин спонт.	379,48±255,09*	1,25±0,02*	9,15±1,24*

Примечание. * – $p < 0,05$ между показателями клинических групп от группы контроля.

Анализируя хемилуминесцентную реакцию с люцигениновым зондом выявлены следующие тенденции: возрастание I_{\max} при спонтанной реакции в 2,3 раза и при активированной в 1,7 раза при развитии экспериментального перитонита. Площадь под кривой хемилуминесцентной реакции увеличилась при спонтанной и активированной реакции в 2,3 раза. Время выхода на пик удлинилось при активированной реакции в 2,9 раза и укоротилось при спонтанной в 1,9 раза.

Увеличение максимальной активности хемилуминесцентной реакции клеток крови у крыс с модели-

руемым перитонитом позволяет судить о возрастании активности клеток, участвующих в неспецифической защите организма в условиях воспалительной реакции [9]. Возрастание площади под кривой на фоне удлиннения времени выхода на пик реакции свидетельствует о недостаточной активности антиоксидантной системы.

При развитии перитонита происходит активация процессов кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови у крыс, что характеризует процессы, как гипероксический тип генерации активных форм кислорода.

Литература

1. Багненко С.Ф., Чепур С.В., Селезнев А.Б., Родионов Г.Г., Мирзабаев А.Т., Великий К.Ф. Внутрикшечное использование субстратного антигипоксанта цитофлавина при экспериментальном моделировании распространенного перитонита // Скорая медицинская помощь. – 2011. – Т. 12, № 2. – С. 12.

2. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л., Багликова К.Е. Исследование противовоспалительных свойств глклопролинов на экспериментальной модели острого перитонита у крыс // Цитокины и воспаление. – 2008. – № 2. Т. 7. – С. 28-32.

3. Винник Ю.С., Якимов С.В., Арапова В.А., Дунаевская С.С. Современные методы санации брюшной полости при распространенном перитоните // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 1-6.

4. Макарская Г.В., Тарских С.В., Турицына Е.Г. Люминол- и люцигенинзависимая хемилуминесценция клеток цельной крови кур в постнатальном онтогенезе // Российская сельскохозяйственная наука. – 2011. – № 3. – С. 46-48.

5. Осочук С.С., Коневалова Н.Ю. Изменения липидной композиции микросом печени крыс при экспериментальном перитоните // Новости хирургии. – 2006. – № 2, Т. 14. – С. 2-6.

6. Рожнова О.М. Особенности функциональной активности нейтрофилов у крыс с экспериментальным асептическим перитонитом на фоне мерказолил индуцированного гипотиреоза // Современные наукоемкие технологии. – 2009. – № 12. – С. 64-65.

7. Русин В.И., Зиматкин С.М., Смотровин С.М. Гистологическая оценка состояния брюшины крыс при экспериментальном перитоните и его лечении с применением фотодинамической терапии // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – № 3 (35). – С. 21-24.

8. Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А., Исаков И.Д., Исакова А.В., Каширина Е.П. Роль нитроксидергической системы в регуляции окислительного стресса в печени у крыс с экспериментальным перитонитом // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-4. – С. 724-731.

9. Цейликман В.Э., Козочкин Д.А., Плеханова Е.В., Савочкина А.Ю., Смирнова Т.Г., Мисюкевич Н.Д. Изменение функциональной активности нейтрофилов перитониального экссудата у крыс при различном моделировании перитонита // Вестник Челябинского государственного университета. – 2013. – № 7 (289). – С. 11.

Literature

1. Bagnenko S.F., Chepur S.V., Seleznev A.B., Rodionov G.G., Mirzabaev A.T., Velikiy K.F. Intraintestinal use of substrate antihypoxiant cytoflavin in experimental simulation of widespread peritonitis // Emergency medical care. – 2011. – Vol. 12, № 2. – P. 12.

2. Bakaeva Z.V., Samonina G.E., Umarova B.A., Kopylova G.N., Goncharova E.L., Baglikova K.E. A study of anti-inflammatory properties of glyprolines using experimental model of the acute peritonitis in rats // Cytokines and Inflammation. – 2008. – № 2, Vol. 7. – P. 28-32.

3. Vinnik Yu.S., Yakimov S.V., Arapova V.A., Dunayevskaya S.S. Current methods of sanitation of the abdominal cavity in diffuse peritonitis // Contemporary Problems of Science and Education. – 2015. – № 6. – P. 1-6.

4. Makarskaya G.V., Tarskikh S.V., Turitsyna E.G. Luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of chicken whole-blood cells during postnatal ontogeny // Russian Agricultural Science. – 2011. – № 3. – P. 46-48.

5. Osouchuk S.S., Konevalova N.Yu. Lipid composition of rats' liver microsomes in experimental peritonitis // Surgery News. – 2006. – № 2, Vol. 14. – P. 2-6.

6. Rozhnova O.M. Peculiarities of the functional activity of neutrophils in rats with experimentally induced aseptic peritonitis on the background of merkazolil-induced hypothyreosis // Modern Science Intensive Technologies. – 2009. – № 12. – P. 64-65.

7. Rusin V.I., Zimatkin S.M., Smotrin S.M. Histological evaluation of the state of the peritoneum in rats with experimental peritonitis and its treatment with photodynamic therapy // Journal of the Grodno State Medical University. – 2011. – № 3 (35). – P. 21-24.

8. Srubilin D.V., Enikeev D.A., Myshkin V.A., Isakov I.D., Isakova A.V., Kashirina E.P. The role of the nitroxidergic system in oxidative stress regulation in the liver of rats with experimental peritonitis // Fundamental Research. – 2014. – № 10-4. – P.724-731.

9. Tseilikman V.E., Kozochkin D.A., Plekhanova E.V., Savochkina A.Yu., Smirnova T.G., Misyukevich N.D. Change in the functional neutrophil status and neutrophil extracellular traps number in rats under stress and its combination with experimental peritonitis // Bulletin of Chelyabinsk State University. – 2013. – № 7 (289). – P. 11.

Координаты для связи с авторами: Винник Юрий Семенович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России; Дунаевская Светлана Сергеевна – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России тел. +7-963-191-29-70, e-mail: Vikto-potapenk@yandex.ru; Арапова Валерия Анатольевна – соискатель кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России; Якимов Сергей Владимирович – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.



УДК 616.805: [613.244 + 577.125]

Б.Я. Рыжавский, О.В. Лазинская

ВЛИЯНИЕ СДЕРЖИВАЮЩЕЙ РОСТ ДИЕТЫ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАЗВИТИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ПРЕПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

*Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск*

Резюме

Исследовался головной мозг (ГМ) полуторамесячных крыс, содержавшихся с месячного возраста на сдерживающей рост диете. Крысы опытной группы имели значительно уменьшенную, по сравнению с контролем, массу тела (на 35,5 %), гонад. Абсолютная масса ГМ у подопытных крыс была меньше, а относительная – больше, чем в контроле. Толщина коры и ее слоя I в переднетеменной доле (ПТД) не имела достоверных межгрупповых различий, в собственно теменной доле (СТД) ГМ имелось уменьшение толщины коры и слоя I. Численная плотность нейронов в коре СТД, размеры ядрышек, ядер и цитоплазмы нейронов СТД, концентрация в их цитоплазме РНК не различались в ГМ подопытных и контрольных крыс. Активность НАДН-д и НАДФН-д в нейронах неокортекса СТД и НАДФН-д в нейронах поля I гиппокампа у подопытных животных была достоверно выше, чем в контроле.

Ключевые слова: головной мозг, сдерживающая рост массы тела диета, морфометрия, гистохимия.

B.Ya. Rizhavskii, O.V. Lazinskaya

THE EFFECT OF GROWTH RESTRAINING DIET ON SOME INDICATORS OF BRAIN DEVELOPMENT IN RATS IN PRE-PUBERTY PERIOD OF ONTOGENESIS.

Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Summary

The authors studied a month and a half old rats who had been on a growth restraining diet since the age of one month. The rats of the experimental group had significantly gonad body mass compared to a control group decreased (35,5 % less). Brain absolute mass in the experimental group of rats was less and a relative was more than in the control group. Thickness of cortex and its layer in the anterior parietal lobe (APL) does not have a reliable intergroup differences. In the parietal proper lobe (PPL) of the brain there was a decrease of cortex thickness and layer I. Quantitative density of neurons in the cortex of PPL, nucleoli size and cytoplasm of PPL neurons, their concentration in RNA cytoplasm did not differ in the brains of experimental and control animals. Activity of NADN-d and NADFN-d in neurons of neocortex of PPL and in the neurons of hippocampus field I as reliably higher in the experimental group compared to a control one.

Key words: brain, restraining the growth of body weight diet, morphometry, histochemistry.

Сдерживающая рост диета – один из методов, в отношении которого доказана способность значительно увеличивать продолжительность жизни экспериментальных животных. Этот эффект описан в 30-х годах прошлого века и многократно подтвержден. Его реализация осуществлялась резким уменьшением калорийности пищи, потребляемой молодыми, растущими крысами [2, 4, 9].

В то же время известно, что в дорепродуктивном периоде онтогенеза у интактных животных между мас-

сой тела и головного мозга (ГМ) имеется положительная корреляционная зависимость. Установлено также, что при экспериментальной акселерации ГМ имеет большую массу, тогда как при сниженной по разным причинам массе тела наблюдаются уменьшение массы ГМ и его полушарий по сравнению с контрольными показателями [1, 5-7].

Значимость этих фактов заслуживает внимания в связи с тем, что повышение и понижение указанных гравиметрических показателей сочетается с показате-