

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ И КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ ОЖОГОВОЙ РАНЫ

© 2009 М.В. Долгушин, В.Г. Соболев

НИИ биофизики Ангарской государственной технической академии

Статья получена 29.09.2009 г.

Оценивали ферментативный статус лимфоцитов периферической крови у кроликов после химического ожога кожи, индуцированного однократным воздействием 50% -ной серной кислоты без последующего смыва (площадь ожоговой раны 6 см Ч 7 см). В динамике ранозаживления в течение пяти недель наблюдались фазовые изменения в активности митохондриальных и гиалоплазматических дегидрогеназ, которые сопровождались устойчивой активацией лизосомальной кислой фосфатазы.

Ключевые слова: *лимфоцит, периферическая кровь, ожоговая рана, заживление*

Опасность ожоговых поражений кожи связана, прежде всего, с возникновением выраженных повреждений на уровне клеток и внутриклеточных структур, что существенно отличает данные патологические состояния от остальных форм профессиональных химических дерматитов. Неизбежная реакция на индуцированную ожогами альтерацию ткани – развитие воспалительного процесса, сдвиги в характере нейрогормональной и иммунной регуляции [8-10, 12]. Подобные вмешательства в согласованную работу механизмов гомеостаза могут способствовать серьезным осложнениям, извращающим нормальный ход ранозаживления и приводящим к сопутствующим расстройствам, связанным с нарушением сопротивляемости к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды [7, 8]. Поэтому одним из аспектов в исследовании особенностей неспецифического ответа на ожоговые поражения был и остается поиск устойчивых морфофункциональных признаков естественного течения тканевой репарации, отсутствие которых может сопровождать развитие неблагоприятных симптомов, усиливающих тяжесть поражения и задерживающих заживление ожоговой раны [8, 12].

В решении подобной задачи представляется вполне обоснованным определение метаболического статуса лимфоцитов периферической крови, оценивая ферментативные показатели – уровень дегидрогеназ и кислой фосфатазы. Анализ динамики активности дегидрогеназ позволяет обнаружить разнонаправленные сдвиги, отражающие реакцию лимфоцитов на общеорганизменные преобразования, участие этих клеток в реализации иммунных и

восстановительных процессов [2, 4-6]. В то же время учет кислой фосфатазы дает возможность оценить реактивность лизосомального аппарата, как источника внутриклеточных субстратов в механизмах адаптации и морфогенеза [1]. В доступной литературе нам не удалось найти работ, специально уделяющих внимание ферментативному статусу иммунокомпетентных клеток при воздействии прижигающих веществ на кожу.

Цель работы – изучить направленность изменения активности дегидрогеназ и кислой фосфатазы в лимфоцитах крови в течение длительного периода ранозаживления после химического ожога.

Эксперимент проводился на кроликах, которые были разделены на 2 группы – опытную и контрольную. Опытная группа включала 12 животных, на которых моделировали кожный химический ожог по методике, описанной ранее [3]. На поверхность выстриженного участка кожи, площадью 6 см x 7 см, однократно наносили 50%-ный раствор серной кислоты без последующего смыва. В контрольную группу входило 8 интактных животных.

Периферическую кровь для оценки метаболических параметров в лимфоцитах забирали на 1-е, 7-е, 14-е, 21-е и 35-е сутки. В течение этих пяти недель следили за ходом течения восстановительного процесса вплоть до практически полного заживления (при завершении эксперимента). После взятия крови готовили мазки, используемые в дальнейшем для постановки цитохимических реакций на сукцинатдегидрогеназу [СДГ], лактатдегидрогеназу [ЛДГ], α -глицерофосфатдегидрогеназу митохондриальную [α -ГФДГ(м)], α -глицерофосфатдегидрогеназу гиалоплазматическую [α -ГФДГ(г/пл)] и кислую фосфатазу [КФ]. Активность дегидрогеназ определяли по методу Р.П. Нарциссова с использованием п-нитротетразолия фиолетового [13], активность КФ – по методу одновременного азосочетания, применяя в качестве субстрата нафтол-AS-MX-фосфат, а в качестве азосочетяющего агента –

Долгушин Максим Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии. E-mail: maxdolg2008@yandex.ru
Соболев Виктор Григорьевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии

прочный синий ВВ [11]. Результаты выражали количественно, в среднем числе гранул на клетку, учитывая на каждом мазке содержание продукта реакции не менее чем в 30-50 лимфоцитах [2]. Достоверность полученных данных оценивали с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Статистически значимые изменения в метаболическом состоянии лимфоцитов крови были выявлены на всех этапах обследования, вплоть до завершения эксперимента (таблица). При этом только реакция кислой фосфатазы была однонаправленной, стимуляция фермента, отмеченная сразу же после ранения, сохранялась до конца опыта, хотя и была менее выраженной, чем в начальный период. В отличие от КФ, изменения в активности окислительных ферментов имели фазовый характер. Это приводило к тому, что каждому из рассмотренных нами этапов ранозаживления был свойственен особый метаболический паттерн (характеризующийся определенным сочетанием

разнонаправленных сдвигов отдельных дегидрогеназ). Кроме того, для каждой дегидрогеназы был отмечен свой собственный «облик» изменения активности в динамике восстановительного процесса. Сходным был лишь их первичный ответ (резко усиленное расходование субстратов окисления, имеющих различную внутриклеточную локализацию), что могло быть одним из проявлений общей катаболической реакции, вызванной воздействием стрессора. Однако вслед за активацией дегидрогеназ неизбежно следовало их ингибирование, которое для СДГ повторялось в дальнейшем. Модификации в активности СДГ отличались наибольшим разнообразием в направленности по отношению к контролю; менее выраженными в этом плане (и к тому же идентичными на первых четырех этапах наблюдения) были изменения у ЛДГ и α -ГФДГ (м), и наименее дифференцированными – у α -ГФДГ (г/пл).

Таблица. Изменения активности ферментов в лимфоцитах периферической крови кроликов в динамике заживления ожоговой раны

Период после ранения	Группа	СДГ	ЛДГ	α -ГФДГ (м)	α -ГФДГ (г/пл)	КФ
1-е сутки	контроль	13,8±0,6	20,1±0,5	12,1±0,8	14,7±0,5	3,1±0,3
	опыт	19,6±0,4**	24,5±0,7**	14,2±0,8*	19,9±0,4**	5,0±0,2**
7-е сутки	контроль	15,3±0,7	20,0±0,4	11,0±0,4	14,9±0,4	3,4 ±0,3
	опыт	11,5±0,6**	25,0±0,9**	16,1±0,6**	12,7±0,4**	4,7±0,3**
14-е сутки	контроль	13,4±0,5	18,6±0,6	10,3±0,4	15,7±0,4	3,2 ±0,2
	опыт	22,1±1,2**	24,7±0,9**	12,3±0,5**	15,8±0,4	4,2 ±0,2**
21-е сутки	контроль	14,2±0,7	20,4±1,2	9,7±0,8	15,2±0,3	2,9 ±0,2
	опыт	11,6±1,0**	15,0±0,7**	5,8±0,3**	15,7±0,3	3,7±0,3*
35-е сутки	контроль	15,3±0,4	21,4±1,1	11,5±0,5	15,2±0,6	2,7±0,2
	опыт	12,8±0,6**	16,7±0,5**	12,1±0,3	15,5±0,5	3,6±0,2*

Примечание: показана достоверность по отношению к контролю (*- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$). Все параметры выражены в среднем числе гранул продукта реакции в клетке

Фазовые изменения в активности дегидрогеназ лимфоцитов при параллельной активации КФ – неспецифическая реакция, выявляемая в динамике после самых разнообразных воздействий [2, 4-6]. Однако, несмотря на неспецифический характер в изменении уровня дегидрогеназ, само сочетание отдельных сдвигов, время их появления и продолжительность, как правило, будет различным (в зависимости от природы и силы влияния экзогенного фактора). В частности, в ходе нашего исследования для дегидрогеназ лимфоцитов не было отмечено метаболических паттернов, выявленных другими авторами при невротических состояниях, вызванных одновременным воздействием интенсивных стрессоров [4]. По завершении стрессирования в указанной работе имело место параллельное снижение уровня окислительных ферментов, но оно проявлялось не на заключительном (как в нашем опыте), а

на первичном этапе последствия. Согласно опубликованным ранее результатам [6] в случае компенсаторной гипертрофии легкого подобный обменный сдвиг в лимфоцитах крови действительно происходил в те же самые сроки, что и у обследованных нами животных с химическим ожогом (как и первичная активация комплекса дегидрогеназ), но при этом отсутствовало обнаруженное в нашем опыте разнонаправленное изменение в активности ферментов глицерофосфатного челночного механизма. По нашим данным, снижение интенсивности окисления α -глицерофосфата в гиалоплазме, ввиду ингибирования обратной реакции на α -ГФДГ (г/пл), сопровождалось более интенсивным расходом данного субстрата в митохондриях, которое при этом достигало максимального значения. Сохранение активации α -ГФДГ (м) параллельно росту СДГ и ЛДГ в лимфоцитах наблюдалась через

две недели после нанесения раны. Это тот самый период, когда первичное послеожоговое угнетение иммунных реакций сменяется их активацией [12]. Понижение уровня α -ГФДГ(м), также может рассматриваться как благоприятное изменение, направленное на более интенсивное расходование α -глицерофосфата на синтез мембранных фосфолипидов [6].

Выводы: в лимфоцитах периферической крови в ходе заживления ожоговой раны наблюдаются фазовые преобразования в активности дегидрогеназ на фоне стабильного возрастания кислой фосфатазы. Данные о метаболических сдвигах, характерных для лимфоцитов при благоприятных исходах репаративных процессов в коже после ожоговых повреждений, могут учитываться в дальнейшем при проведении мероприятий по оценке риска развития осложнений, которые, безусловно, будут сопровождаться появлением особенностей в состоянии обмена иммунокомпетентных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Ефремов, А.В.* Роль лизосомальных ферментов в генезе ведущих клинико-патологических синдромов: факты и гипотезы / *А.В. Ефремов, Л.А. Рукоткина, О.В. Цыганкова, З.Г. Бондарева* // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. - №1. – С. 18-21.
2. *Логинов, А.Г.* Состояние энергетического метаболизма лимфоцитов регионарного лимфатического узла при имплантации никелида титана // Бюл. СО РАМН. – 2005. - №2. – С. 139-142.
3. *Малышкина, Н.А.* Динамика некоторых показателей состояния животных при исследовании ранозаживляющего действия нового фармакологического вещества из природного сырья // Дальневосточная весна – 2008: Материалы межд. науч.-практич. конф. в области экологии и безопасности жизнедеятельности. – Комсомольск-на-Амуре. – С. 445-447.
4. *Плесцов, О.Л.* Активность ферментов лимфоцитов периферической крови при экспериментальном неврозе / *О.Л. Плесцов, Э.Г. Заркешев* // Физиол. журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1990. - №8. – С. 1103-1106.
5. *Робинсон, М.В.* Морфология и метаболизм лимфоцитов / *М.В. Робинсон, Л.Б. Топоркова, В.А. Труфакин*. – Новосибирск: Наука, 1986. – 128 с.
6. *Bilitch, G.L.* The status of the lymphoid system under conditions of lung regeneration stimulation / *G.L. Bilitch, L.V. Nazarova, V.N. Otmakov* // Folia Haematol. (Lpz) – 1982. - №3. – P. 416-429.
7. *Guo, Z.* Burn injury promotes antigen-driven Th 2 type responses in vivo / *Z. Guo, E. Kavanagh, Y. Zang et al.* // J. Immunol. – 2003. - №8. – P. 3983-3990.
8. *Heideman, M.* The immunologic response to thermal injury / *M. Heideman, A. Bengtsson* // World J. Surg. – 1992. - № 1. – P. 53-56.
9. *Jeschke, M.G.* Endogenous anabolic hormones and hypermetabolism: effect of trauma and gender differences / *M.G. Jeschke, R.E. Barrow, R.P. Mleak, D.N. Herndon* // Ann. Surg. – 2005. - №5. – P. 759-767.
10. *Kawakami, M.* Immunoglobulin synthesis by cultured lymphocytes from spleen and mesenteric lymph nodes after thermal injury / *M. Kawakami, S. de Serres, A.A. Meyer* // J. Burn Care Rehabil. – 1991. - №5. – P. 474-481.
11. *Micu, D.* Behaviour of leukocyte acid phosphatase in various chronic diseases / *D. Micu, E. Mihailescu, D. Cheta et al.* // Rev. Roum. Med.- Med. Interne. – 1976. - №2. – P. 103-107.
12. *Pratt, V.C.* Alterations in lymphocyte function and relation to phospholipid composition after burn injury in humans / *V.C. Pratt, E.E. Tredget, M.T. Clandinin, C.J. Field* // Crit. Care Med. – 2002. - № 8. – P. 1753-1761.
13. *Suchorikov, V.S.* Peripheral lymphocytes as a mitochondrial insufficiency test / *V.S. Suchorikov, R.P. Nartsissov, S.V. Petrichuk et al.* // Eur. J. Med. Res. – 2000. - №1. – P. 48-49.

CHANGE OF DEHYDROGENASES AND ACID PHOSPHATASE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN THE DYNAMICS OF BURN WOUND REPAIR

© 2009 M.V. Dolgushin, V.G. Sobolev
Scientific Research Institute of Biophysics
Angarsk State Technical Academy
Article is received 2009/09/29

Estimated enzymatic status of peripheral blood lymphocytes at rabbits after the leather chemical burn induced by unitary influence of 50% sulfuric acid without the subsequent washout (the area of burn wounds is 6 cm x 7 cm). In dynamics of wound repair within five weeks phase changes in mitochondrial and hyaloplasmatic dehydrogenases activity which were accompanied by steady lysosomal acid phosphatase activation were observed.

Keywords: *lymphocyte, peripheral blood, burn wound, repairing*

Maksim Dolgushin, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Toxicology Division. E-mail: maxdolg2008@yandex.ru
Viktor Sobolev, Candidate of Medicine, Senior Research Fellow at the Toxicology Division