

Assoc. Prof. **Tetiana Lakhtadyr**, PhD, Bogomolets National Medical University (Ukraine, Kyiv)
Victor Cherkasov, DSc, Bogomolets National Medical University (Ukraine, Kyiv)
Assist. **Ludmila Turbal**, Bogomolets National Medical University (Ukraine, Kyiv)
Assist. **Snizhana Doroshchuk**, Bogomolets National Medical University (Ukraine, Kyiv)
Assoc. Prof. **Rostislav Kaminskiy**, PhD, Bogomolets National Medical University (Ukraine, Kyiv)

STRUCTURAL CHANGES IN RENAL CORTEX IN EXPERIMENTAL SKIN BURN INJURY AND UNDER THE CONDITIONS OF USE OF INFUSION SOLUTIONS

Introduction. With deep and significant skin burns, structural and functional disorders occur in almost all organs and systems, leading to the development of burn disease. Among the factors of these changes of cells, tissues, organs and systems of the burned organism are imbalance of water-salt homeostasis and endogenous intoxication. Therefore, for optimal treatment and prevention of the effects of thermal injuries, it is quite reasonable to use infusion solutions to reduce the level of toxins in the body and normalize water-salt metabolism. Among colloidal solutions, the group of hydroxyethylated starches claims to be in the first place, but there is debate over the appropriateness of using some of them in certain clinical situations. That is why there is a need to develop new colloidal solutions of this group and to comparatively study the structural manifestations of their action on the internal organs of burns. Meanwhile, in the scientific literature there are no data on the structural changes of the cortical substance of the kidneys and the course of its regenerative processes in the late period after burn injury of the skin under the conditions of infusion of a new colloid-electrolyte-hyperosmolar drug HAES-LX-5%. Research to establish the structural features of damages and compensatory-adaptive changes in the renal cortex of rats in the later stages after experimental burn the skin under the conditions of the intravenous infusion of isotonic NaCl solution and integrated hyperosmolar solutions (Lactoproteinum with sorbitol and HAES-LX-5% was conducted 105 white male rats weighing 155-160 g. Aim of research is the establishment of structural features of the course of the adaptive-compensatory and regenerative processes in the cortical substance of the rat kidney in late terms after experimental burn skin injury and the use of HAES-LX-5% is relevant for theoretical and practical medicine.

Relevance to issues. The study has revealed one of the pathogenesis of complications of burn injuries of the skin, to determine the features of morphological changes of renal cortex and identify the positive impact of timely intravenous infusion combined hyperosmolar solutions on the structure of one of the main organs for the removal of the toxins from the body, which is the kidney.

It is proved that (unlike isotonic NaCl solution) Lactoproteinum with sorbitol and HAES-LX-5% do specific cell protective effect on structure in renal cortex of burned rats, thus showing nephroprotectoric properties. Specifically, Lactoproteinum with sorbitol peculiar is newly ultrastructural demonstration effect of strengthening strukturalisation of mitochondria in epithelial cells by increasing the thickness and density of electronic components all of the mitochondrial membrane. Strengthening of the mitochondrial membrane in some mitochondria is a regulator and protector of massive mitoptosis. The maximum effect is that most of the mitochondria within 14 days after the burn and gradually disappears, covering all of the smaller mitochondria, 21 days and 30 days after the burn (as the improvement in structural changes in the renal cortex and overall clinical condition of burned rats). Thus, it is a structural marker expression and "tense situation" in the cell, as well as a testimony to "improve this situation" (in this case, Lactoproteinum with sorbitol reveals his first-footed properties of the mitochohdrial tread).

Purpose. Aim of research is the establishment of structural features of the course of the adaptive-compensatory and regenerative processes in the cortical substance of the rat kidney in late terms after experimental burn skin injury and the use of HAES-LX-5% is relevant for theoretical and practical medicine.

Methods. The research is a component of the research work of the Department of Human Anatomy of the National Medical University. Bogomolets "Morphological changes of functionally different organs in the conditions of experimental burn injury" (state registration number 0115U000010), as well as performed within the framework of joint research work (planned in accordance with the agreement on scientific cooperation between O. Bogomolets National Medical University and Vinnitsa National Medical University named after MI Pirogov) "Experimental substantiation of the effectiveness of complex infusion drugs on the model of burn disease in animals", which is a fragment of the planned of research work "To create new complex colloidal blood substitutes of polyfunctional action and solutions for resuspension of red blood cells (laboratory-experimental substantiation of their use in transfusiology)" (KPKV6561040, state registration number 0107U001132). The experimental animals were divided into 7 groups (fifteen animals per group): I – intact animals; II, III, IV – rats without thermal injury who underwent single intravenous infusion of isotonic NaCl solution, HAES-LX-5% and Lactoproteinum with sorbitol and once daily for the first 7 days, respectively, at a dose of 10 ml/kg; V, VI, VII – animals with burns, which, along similar lines, and the dose in the same mode conducted separate investigational solutions. Animal retention and handling were carried out in full compliance with the requirements of the "General Ethical Principles for Animal Experiments", approved by the First National Congress

on Bioethics (Kyiv, 2001), with strict adherence to the recommendations of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals and Experimental Use "other scientific purposes", the provisions of the methodological recommendations "Preclinical study of medicinal products". Keeping rats setting up experiments, removing the animals from the rest of the experiments and related procedures carried out in accordance with existing bioetic requirements. Skin burn injury modeled by sprinkleduring ten seconds before the pre-shaved rat body side surfaces 4 hot copper plates (two on each side, each area – 13.86 cm²). The plates were heated by immersing them for 6 minutes in water at a constant temperature of 100°C. Total area of burn injuries amounted to 21-23% of body surface experimental rats, which is sufficient for the formation of burns II-III, accompanied by shock moderate severity. Material for morphological studies was processed according to conventional methods. For histological examination, tissue sections were stained with hematoxylin-eosin. Ultra-thin sections were prepared on an LKB ultramicrotome, and examined and photographed using a PEM-125K electron microscope. Semi-thin sections were stained with toluidine blue and methylene blue azure II. Images from histological specimens stained with hematoxylin-eosin were taken to a computer monitor using a MICROmed SEO SCAN microscope and a Vision CCD Camera. Morphometric studies were carried out using VideoTest-5.0, CAARA Image Base and Microsoft Excel on a personal computer. Statistical processing of the obtained quantitative data was performed using the software "Excel" and "STATISTICA" 6.0 using parametric methods. For all indicators the values of arithmetic mean (M), error of arithmetic mean (m) and standard deviation (σ) were calculated. The significance of the difference of values between the independent quantitative values was determined at normal distribution by the Student's t-test. In all cases, $n = 30$. Differences at $p < 0,05$ are considered valid.

Results. Using light and electron microscopy and morphometry followed by statistical processing obtained indices for the first time established the structural features of damages and compensatory-adaptive changes in the cortex of the kidneys of rats in the later stages after experimental burn of skin II-III degree, provided the use of an intravenous infusion of isotonic NaCl solution and hyperosmolar solutions (Lactoproteinum with sorbitol and HAES-LX-5%). Given the infusion of isotonic NaCl solution there mainly necrotic changes in cells that are accompanied by the development of interstitial edema, hemorrhage appearance and lymphocytic infiltrates. Given infusion Lactoproteinum with sorbitol and HAES-LX-5% spread destructive changes in renal cortex of rats is inhibitedburned and substantially altered both in time and in spatial dimensions. Proved that the infusion of hyperosmolar solutions applied braking provides necrotic cells, thus inhibits the inflammatory

response and promotes limited, local nature of necrotic and apoptotic changes. It was found that in rats without burn of the skin occurs mitoptosis of isolated mitochondria in epithelial cells of nephrons. This mitoptosis can be defined as basic (unstimulated) mechanism of intracellular quality control structures by removing old and defective mitochondria. For the first time described a massive mitoptosis in epitheliocytes of tubules of nephrons in burned rats, which are a form of response to factors of burn disease on cells; a mitoptosis can be defined as induced. Manifestations of its morphological differences are: 1) the large number of structurally distorted condensed mitochondria; 2) accumulation of autophagosomes; 3) association with a transparent vacuoles containing a large number heteromorphous of autophagosomes containing varying degrees of structural degradation. For the first time found that the stability of the size and distribution of mitochondria in the cytoplasm of epithelial cells in tubules of nephrons of burned rats is impaired. Mitochondria are subject mitoptosis; the formation of new mitochondria by kidney formation and separation; mitochondria fuse with one another, forming a separate and integrated into the network giant branched "mitochondrial complexes". This process is dualistic meaning: on the one hand – this is a manifestation of compensatory-adaptive reactions thereby increasing the resistance of mitochondria; on the other – this leads to distortion and extinction primary-side folded rim that has a significant impact on the state of reabsorption. Identified in two forms of mitoptosis in epitheliocytes nephron tubules of burned rats related to: 1) damage of external mitochondrial membrane; 2) preservation of external mitochondrial membrane and attracting autophagic (mitophagic) mechanisms. In the first case mitochondria first condensed, followed by swelling of the matrix and fragmentation crista by the destruction of crista junctions. Finally, the external mitochondrial membrane ruptures and the remains of crista (as bubbles) out into the cytoplasm. In the second case mitochondria condensation occurs bubble fragmentation of crista, but external mitochondrial membrane rupture occurs and mitochondria absorbed by autophagosome (or converted in autophagosome). Next autophagosome merge with lysosomes and education autophagolysosoma that, under conditions effective digestion content transformed into vacuoles. Last extrusion by exocytosis and ensure the release of cells from the degraded material.

Conclusions. Only a lactoprotein with sorbitol has a membrane-plastic effect aimed at strengthening the mitochondrial membrane, in part of the mitochondria of epithelial cells of nephron tubules is ultrastructurally increased by the electron density and thickness of all components of the mitochondrial membrane. The maximal membrane effect of the action of lactoprotein with sorbitol on the mitochondria manifests itself fourteen days after the experimental burn skin injury and gradually

(twenty-one and thirty days later) disappears, which coincides with the improvement of the overall clinical condition. There is every reason to believe that increased structuralisation of mitochondria is a safeguard for the spread of mitoptosis and mitophagy, the excessive nature of which can lead to cell death.

Keywords: skin burn injury, infusion solutions, Lactoproteinum with sorbitol, HAES-LX-5%, structural changes, renal cortex.

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ В КІРКОВІЙ РЕЧОВИНІ НИРОК ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ОПІКОВІЙ ТРАВМІ ШКІРИ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ІНФУЗІЙНИХ РОЗЧИНІВ

Вступ. При глибоких і значних опіках шкіри майже всі органи і системи виникають структурно-функціональні порушення, що призводять до розвитку опікової хвороби. Серед факторів цих змін клітин, тканин, органів та систем спаленого організму – дисбаланс водно-сольового гомеостазу та ендогенна інтоксикація. Тому для оптимального лікування та профілактики наслідків термічних травм цілком розумно використовувати інфузійні розчини для зниження рівня токсинів в організмі та нормалізації водно-сольового обміну. Серед колоїдних розчинів на перше місце претендує група гідроксиетильованих крохмалів, однак існує дискусія щодо доцільності використання деяких з них у певних клінічних ситуаціях. Ось чому виникає необхідність у розробці нових колоїдних розчинів цієї групи та порівняльному вивченні структурних проявів їх дії на внутрішні органи опіків. Тим часом у науковій літературі немає даних про структурні зміни коркової речовини нирок та перебіг її регенеративних процесів у пізній період після опікової травми шкіри в умовах інфузії нового колоїду-електроліту- гіперосмолярний препарат HAES-LX-5%. Дослідження для встановлення структурних особливостей пошкоджень та компенсаторно-адаптаційних змін кори нирок щурів на пізніх стадіях після експериментального опіку шкіри в умовах внутрішньовенної інфузії ізотонічного розчину NaCl та інтегрованих гіперосмолярних розчинів (лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% проводили 105 білих щурів-самців масою 155-160 р. Метою дослідження є встановлення структурних особливостей перебігу адаптаційно-компенсаторних та регенеративних процесів в кірковій речовині нирки щурів у пізні терміни після експериментальної опікової травми шкіри та використання HAES-LX-5% є актуальним для теоретичних та практичної медицини.

Відповідність проблематиці. Дослідження виявило один із патогенезів ускладнень опікових травм шкіри, щоб визначити особливості морфологічних змін кори нирок та виявити позитивний вплив своєчасної внутрішньовенної

інфузії комбінованих гіперосмолярних розчинів на структуру одного з основних органів для виведення токсинів з організму, що є ниркою. Доведено, що (на відміну від ізотонічного розчину NaCl) лактопротеїн з сорбітом та HAES-LX-5% роблять специфічний захисний вплив на структуру в нирковій корі обпалених щурів, демонструючи таким чином нефропротекторні властивості. Зокрема, лактопротеїн із властивим сорбітом – це нещодавно ультраструктурний демонстраційний ефект посилення структуризації мітохондрій в епітеліальних клітинах за рахунок збільшення товщини та щільності електронних компонентів усєї мітохондріальної мембрани. Зміцнення мітохондріальної мембрани в деяких мітохондріях є регулятором і захисником масивного мітоптозу. Максимальний ефект полягає в тому, що більша частина мітохондрій протягом 14 днів після опіку і поступово зникає, охоплюючи всі менші мітохондрії, через 21 день і 30 днів після опіку (як поліпшення структурних змін кори нирок і загального клінічного стану спалених щурів). Таким чином, це експресія структурного маркера та „напружена ситуація” в клітині, а також свідчення „поліпшення цієї ситуації” (у цьому випадку лактопротеїн із сорбітом виявляє його первісні властивості мітохондріального протектора).

Мета. Метою дослідження є встановлення структурних особливостей перебігу адаптаційно-компенсаторних та регенеративних процесів в кірковій речовині нирки щурів у пізні терміни після експериментальної опікової шкіри та використання HAES-LX-5% є актуальним для теоретичних та практичної медицини.

Методи. Слід назвати методи, застосовані в дослідженні, і обов'язково пояснити, яким чином було застосовано кожен метод. Дослідження є складовою науково-дослідної роботи кафедри анатомії людини Національного медичного університету. Богомольця „Морфологічні зміни функціонально різних органів в умовах експериментальної опікової травми” (державний реєстраційний номер 0115U000010), а також виконані в рамках спільної науково-дослідної роботи (запланованої відповідно до угоди про наукове співробітництво Національної медичної медицини ім. О. Богомольця Університету та Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова) „Експериментальне обґрунтування ефективності комплексних інфузійних препаратів на моделі опікової хвороби у тварин”, що є фрагментом запланованої науково-дослідної роботи „Створення нових складних колоїдних замінників крові поліфункціональна дія та розчини для ресуспензії еритроцитів (лабораторно-експериментальне обґрунтування їх використання в трансфузіології) „(КПКВ6561040, державний реєстраційний номер 0107U001132). Дослідних тварин поділили на 7 груп (п'ятнадцять тварин

на групу): I – неушкоджені тварини; II, III, IV – щури без термічного ушкодження, яким протягом перших 7 днів проводили разову внутрішньовенну інфузію ізотонічного розчину NaCl, HAES-LX-5% та лактопротеїну сорбітом та один раз на добу відповідно дози 10 мл/кг; V, VI, VII – тварини з опіками, яким за аналогічною лінією та дозою в одному режимі проводили окремі досліджувані розчини. Утримання тварин та поводження з ними здійснювались у повній відповідності до вимог „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, затверджених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.), з чітким дотриманням рекомендацій „Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин та експериментальне використання „інших наукових цілей”, положення методичних рекомендацій „Доклінічне вивчення лікарських засобів”. Утримання щурів, що встановлюють експерименти, відводять тварин від решти експериментів та пов'язаних з ними процедур, що проводяться відповідно до існуючих біоетичних вимог. Травма опіку шкіри моделюється розпилюванням за десять секунд перед попередньо поголеними бічними поверхнями тіла щурів 4 гарячими мідними пластинами (по дві з кожної сторони, кожна область – 13,86 см²). Пластини нагрівали шляхом занурення їх на 6 хвилин у воду при постійній температурі 100°C. Загальна площа опікових травм становила 21-23% поверхонь тіла експериментальних щурів, що достатньо для утворення опіків II-III, що супроводжуються шоком середньої тяжкості. Матеріал для морфологічних досліджень обробляли за звичайними методами. Для гістологічного дослідження зрізи тканин фарбували гематоксилін-еозином. Надтонкі зрізи були підготовлені на ультрамикротомі ЛКБ та досліджені та сфотографовані за допомогою електронного мікроскопа РЕМ-125К. Напівтонкі ділянки фарбували толуїдиновим синім та метиленовим синім блакитом II. Знімки з гістологічних зразків, забарвлених гематоксилін-еозином, виносили на монітор комп'ютера за допомогою мікроскопа MICROmed SEO SCAN та CCD-камери Vision. Морфометричні дослідження проводилися за допомогою VideoTest-5.0, CAARA Image Base та Microsoft Excel на персональному комп'ютері. Статистичну обробку отриманих кількісних даних проводили за допомогою програмного забезпечення “Excel” та “STATISTICA” 6.0 за допомогою параметричних методів. Для всіх показників були розраховані значення середнього арифметичного (M), похибки середнього арифметичного (m) та стандартного відхилення (σ). Значення різниці значень між незалежними кількісними значеннями визначали при нормальному розподілі за допомогою тесту Ст'юдента. У всіх випадках $n = 30$. Відмінності при $p < 0,05$ вважаються достовірними.

Результати. За допомогою світлової та електронної мікроскопії та морфометрії з подальшою статистичною обробкою отриманих показників вперше встановлено структурні особливості пошкоджень та компенсаторно-адаптаційних змін у корі нирок щурів на пізніх стадіях після експериментального опіку шкіри II-III ступеня, за умови використання внутрішньовенної інфузії ізотонічного розчину NaCl та гіперосмолярних розчинів (лактопротеїн зі сорбітом та HAES-LX-5%). Враховуючи інфузію ізотонічного розчину NaCl, відбуваються переважно некротичні зміни в клітинах, що супроводжуються розвитком інтерстиціального набряку, появою крововиливів та лімфоцитарних інфільтратів. Враховуючи інфузію лактопротеїну з сорбітом та HAES-LX-5%, деструктивні зміни в нирковій корі щурів гальмуються та істотно змінюються як у часі, так і в просторових розмірах. Доведено, що впливання гіперосмолярних розчинів при застосуванні гальмування забезпечує некротичні клітини, таким чином, пригнічує запальну реакцію та сприяє обмеженому, локальному характеру некротичних та апоптотичних змін. Було встановлено, що у щурів без опіку шкіри відбувається мітоптоз ізольованих мітохондрій в епітеліальних клітинах нефронів. Цей мітоптоз можна визначити як основний (нестимульований) механізм внутрішньоклітинних структур контролю якості шляхом видалення старих та дефектних мітохондрій. Вперше описаний масивний мітоптоз в епітеліоцитах каналців нефронів у спалених щурів, які є формою реакції на фактори опікової хвороби на клітинах; мітоптоз можна визначити як індукований. Проявами його морфологічних відмінностей є: 1) велика кількість структурно спотворених конденсованих мітохондрій; 2) скупчення аутофагосоми; 3) асоціація з прозорими вакуолями, що містять велику кількість гетероморфних аутофагосоми, що містять різну ступінь структурної деструкції. Вперше встановлено, що стабільність розміру та розподілу мітохондрій у цитоплазмі епітеліальних клітин у каналцях нефронів спалених щурів порушена. Мітохондрії піддаються мітоптозу; утворення нових мітохондрій шляхом утворення та відділення нирок; мітохондрії зливаються між собою, утворюючи окремі і інтегровані у мережу гігантський розгалужений „мітохондріальний комплекс”. Цей процес має дуалістичне значення: з одного боку – це прояв компенсаторно-адаптаційних реакцій, тим самим збільшуючи стійкість мітохондрій; з іншого – це призводить до викривлення і згасання первинного бічного складеного обода, що має істотний вплив на стан реабсорбції. Виявлено у двох формах мітоптозу в епітеліоцитах нефронних каналців обпалених щурів, пов'язаних із: 1) пошкодженням зовнішньої мітохондріальної мембрани; 2) збереження зовнішньої мітохондріальної

мембрані залучення аутофагічних (мітофагічних) механізмів. У першому випадку мітохондрії спочатку конденсуються, з подальшим набуханням матриці та фрагментацією кристи руйнуванням кристових з'єднань. Нарешті, зовнішня мітохондріальна мембрана розривається, а залишки кристи (у вигляді бульбашок) виходять у цитоплазму. У другому випадку відбувається конденсація мітохондрій, міхурчаста фрагментація кристи, але відбувається розрив зовнішньої мітохондріальної мембрани і мітохондрії, поглинені аутофагосою (або перетвореною аутофагосою). Далі аутофагосома зливається з лізосомами і утворюється аутофаголізосома, яка в умовах ефективного вмісту травлення трансформується у вакуолі. Остання екструзія екзоцитозом і забезпечує вивільнення клітин з деградованого матеріалу.

Висновки. Лише лактопротеїн із сорбітом має мембранно-пластичну дію, спрямовану на зміцнення мітохондріальної мембрани, у частині мітохондрій епітеліальних клітин каналців нефрону ультраструктурно збільшується за електронною щільністю та товщиною всіх компонентів мітохондріальної мембрани. Максимальний мембранний ефект дії лактопротеїну з сорбітом на мітохондрії проявляється через чотирнадцять днів після експериментальної опікової травми шкіри і поступово (двадцять один і тридцять днів пізніше) зникає, що збігається з поліпшенням загального клінічного стану. Є всі підстави вважати, що посилена структуралізація мітохондрій є гарантією поширення мітоптозів та мітофагій, надмірний характер яких може призвести до загибелі клітин.

Ключові слова: травма опіку шкіри, інфузійні розчини, лактопротеїн з сорбітом, HAES-LX-5%, структурні зміни, кора нирок.