

УДК 611.018.54:615.014.41:615.015.45:616.5-001.19

*И.О. Ищенко, Л.Н. Тыныныка, Г.А. Ковалев,
И.А. Ефимова*, Б.П. Сандомирский*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Харьковская областная клиническая травматологическая больница

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СЫВОРОТКИ КОРДОВОЙ КРОВИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЕСТРУКЦИИ ТКАНЕЙ

Изучались биохимические маркеры деструкции тканей в сыворотке крови и коже животных с холодowymi ранами при лечении криоконсервированной сывороткой кордовой крови. Показано, что введение криоконсервированной сыворотки кордовой крови способствует снижению уровня маркеров деструкции тканей в сыворотке, что проявляется в нормализации активности АЛТ на 7-е сутки эксперимента, АСТ и ЛДГ на 14-е сутки. Уровень перекисного окисления липидов в коже достигает значений нормы на 9-е сутки наблюдения.

Ключевые слова: *холодовые раны, маркеры деструкции тканей, криоконсервированная сыворотка кордовой крови.*

Причинами повышения активности ферментов в сыворотке крови являются прямое поражение клеточных мембран, гипоксия, аноксия и ишемия тканей; иногда активность ферментов увеличивается в результате повышенного их синтеза в тканях [1]. Значительная активность ЛДГ, АСТ и АЛТ обнаружена в скелетных мышцах и коже, что позволяет рассматривать активность этих ферментов в сыворотке крови в качестве биохимических маркеров повреждения [2–6]. Криодеструкция тканей неминуемо сопровождается повышением активности перекисных процессов [7–9]. Таким образом, мониторинг активности ЛДГ, АСТ и АЛТ в сыворотке крови и уровня перекисного окисления липидов в коже позволяет оценивать степень повреждения тканей.

Целью данной работы было определение динамики активности ЛДГ, АСТ, АЛТ в сыворотке крови и уровня ТБК-активных продуктов в коже при лечении криоконсервированной сывороткой кордовой крови (КСКК) животных с холодowymi ранами.

Материал и методы. Работу выполняли на крысах сфинкс в соответствии с требованиями комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины, согласованными с директивой Европейского парламента и Совета ЕС от 22.09.10 [10]. Раны моделировали на латеральной

поверхности бедра. Применяли криоинструмент с активно охлаждаемым аппликатором диаметром 8,0 мм ($t = -195$ °С, время экспозиции – 60 с). Животные были разделены на группы по 10 особей в каждой. Крысам контрольной группы вводили изотонический раствор NaCl, крысам группы сравнения – экстракт плаценты, крысам экспериментальной группы – КСКК. Инъекции начинали с третьих суток после криодеструкции через день по 0,1 мл/кг массы тела внутримышечно (в здоровую лапу) на протяжении девяти дней. Применяли изотонический раствор NaCl («Юрия-Фарм», Украина), КСКК человека, предоставленную низкотемпературным банком ИПКиК НАН Украины, и медицинский препарат «Экстракт плаценты» («Биофарма», Украина).

Активность ЛДГ (набор «ERBA-Lachema»), АСТ и АЛТ (наборы «BioSystems») в сыворотке крови и уровень ТБК-активных продуктов в коже [2] определяли на спектрофотометре Hitachi-U3210 (Япония). Гомогенаты кожи готовили из предварительно замороженных фрагментов, которые гомогенизировали в 0,1 М трис-HCl в буферном растворе (pH 7,4).

Полученные цифровые данные статистически обрабатывали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (при $p < 0,05$).

© И.О. Ищенко, Л.Н. Тыныныка, Г.А. Ковалев и др., 2016

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования динамики активности ЛДГ в сыворотке крови животных представлены на рис. 1. Как видно из рис. 1, на 7-е сутки

ЛДГ до значений нормы $[(74,7 \pm 9,8) \text{ мккат/л}]$. В группе животных с введением экстракта плаценты содержание ЛДГ уменьшилось в 1,5 раза и составило $(107,1 \pm 13,7) \text{ мккат/л}$. На 21-е

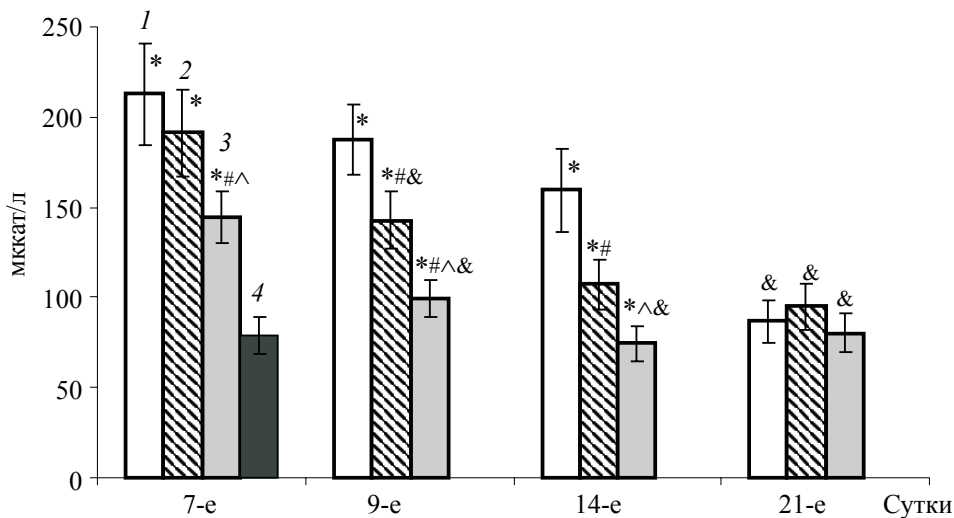


Рис. 1. Активность ЛДГ в сыворотке крови у животных контрольной (1), сравнения (2), экспериментальной (3) и интактной (4) групп. $p < 0,05$ по отношению к интактной группе*, к контрольной группе #, к группе сравнения ^, к соответствующей группе на предыдущий срок наблюдения &

наблюдения у нелеченных животных уровень ЛДГ был в 2,7 раза выше нормы и составлял $(212,7 \pm 28,3) \text{ мккат/л}$. Введение КСКК сопровождалось снижением уровня ЛДГ в 1,5 раза $[(144,4 \pm 14,0) \text{ мккат/л}]$. Применение экстракта плаценты $[(191,3 \pm 24,4) \text{ мккат/л}]$ не влияло на изменение исследуемого показателя по сравнению с показателем в контрольной группе. При увеличении срока наблюдения до девяти суток достоверного изменения активности ЛДГ у животных контрольной группы не отмечено $[(187,3 \pm 19,6) \text{ мккат/л}]$. В то же время применение экстракта плаценты и КСКК способствовало снижению изучаемого показателя соответственно в 1,3 $[(142,9 \pm 15,5) \text{ мккат/л}]$ и 1,5 $[(99,4 \pm 10,1) \text{ мккат/л}]$ раза (рис. 1). Активность ЛДГ в группе сравнения и экспериментальной группе по сравнению с результатами в контрольной группе на 9-е сутки наблюдения снижалась соответственно в 1,3 и 1,9 раза. На 14-е сутки наблюдения содержание ЛДГ в сыворотке крови животных с моделированием холодовых ран (контрольная группа) не отличалось от показателей на предыдущий срок наблюдения $[(159,5 \pm 23,3) \text{ мккат/л}]$. Значения активности изучаемого анализа в группе сравнения и экспериментальной уменьшались в 1,3 раза. При этом большим влиянием обладала КСКК, ее применение сопровождалось снижением уровня

сутки наблюдения активность изучаемого анализа во всех группах возвращалась к нормальным значениям.

Результаты определения активности АСТ в сыворотке крови приведены на рис. 2. Через 7 суток после моделирования холодовых ран у животных контрольной группы имело место повышение активности АСТ $[(328,3 \pm 44,8) \text{ Ед/л}]$ в 3,1 раза по сравнению со значениями у интактных крыс. Введение экстракта плаценты или КСКК (группа сравнения и экспериментальная) приводило к уменьшению данного показателя в 1,4 и 1,7 раза соответственно по сравнению результатами в контрольной группе. Следует отметить, что исследуемый показатель у животных в экспериментальной группе $[(188,9 \pm 21,3) \text{ Ед/л}]$ был в 1,3 раза ниже, чем в группе сравнения $[(242,5 \pm 30,3) \text{ Ед/л}]$. По сравнению с предыдущим сроком наблюдения на 9-е сутки активность АСТ в контрольной и группе сравнения не изменилась и составила $(309,6 \pm 41,9)$ и $(220,2 \pm 33,4) \text{ Ед/л}$ соответственно. Снижение указанного показателя (в 1,3 раза) отмечалось лишь в экспериментальной группе $[(142,1 \pm 17,8) \text{ Ед/л}]$. Однако по сравнению с результатами в контрольной группе было зафиксировано уменьшение активности изучаемого анализа как в группе сравнения, так и в экспериментальной группе (в 1,4 и 2,2 раза

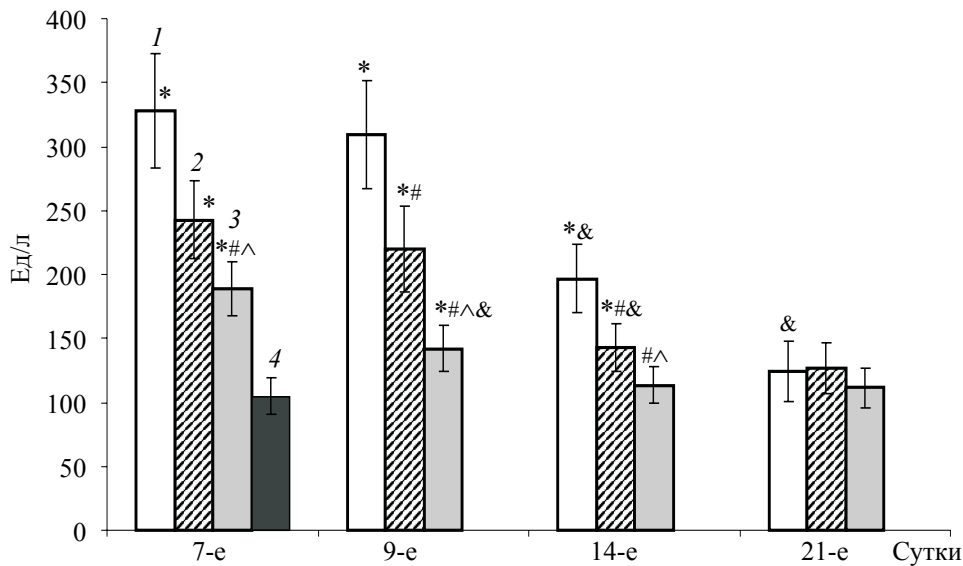


Рис. 2. Активность АСТ в сыворотке крови у животных контрольной (1), сравнения (2), экспериментальной (3) и интактной (4) групп. $p < 0,05$ по отношению к интактной группе*, к контрольной группе #, к группе сравнения ^, к соответствующей группе на предыдущий срок наблюдения &

соответственно). При этом исследуемый показатель в группе сравнения и экспериментальной имел статистически значимые отличия. На 14-е сутки наблюдения активность АСТ в контрольной группе составила $(196,5 \pm 26,6)$ Ед/л, что в 1,6 раза ниже, чем на предыдущий срок наблюдения. Исследуемый показатель в группе сравнения также уменьшился и достиг $(143,1 \pm 18,3)$ Ед/л, что в 1,5 раза меньше, чем на 9-е сутки наблюдения. Активность АСТ в экспериментальной группе оставалась стабильной и составила $(113,1 \pm 14,3)$ Ед/л. Активность изучаемого анализита в

группе сравнения по сравнению с данными, полученными у животных контрольной группы, была в 1,4 раза меньше. Введение КСКК сопровождалось нормализацией активности АСТ. На 21-е сутки эксперимента статистически значимых отличий между показателями во всех группах не отмечалось. Таким образом, к указанному сроку наблюдения имела место нормализация активности АСТ даже у животных контрольной группы.

Динамика активности АЛТ в сыворотке крови экспериментальных животных показана на рис. 3. Спустя семь суток после крио-

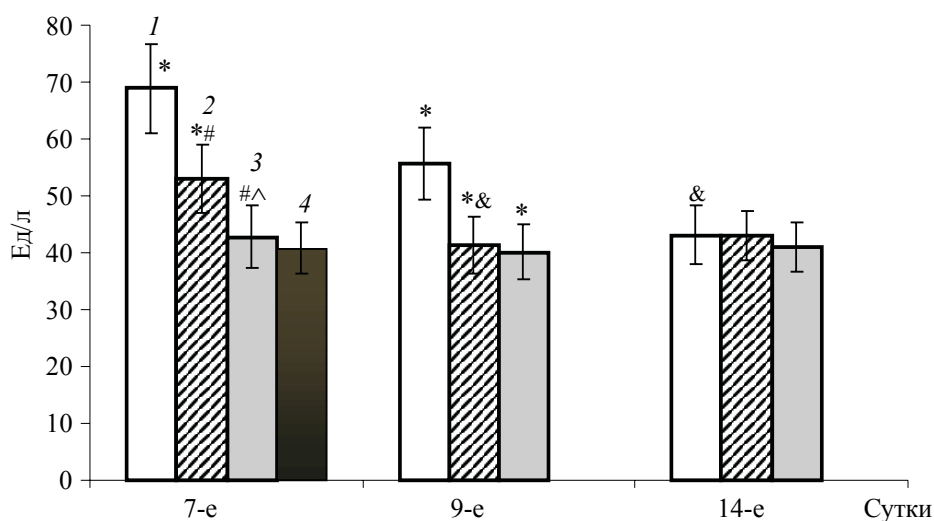


Рис. 3. Активность АЛТ в сыворотке крови у животных контрольной (1), сравнения (2), экспериментальной (3) и интактной (4) групп. $p < 0,05$ по отношению к интактной группе*, к контрольной группе #, к группе сравнения ^, к соответствующей группе на предыдущий срок наблюдения &

деструкции кожи активность АЛТ у крыс контрольной группы составляла $(68,9 \pm 7,9)$ Ед/л, что в 1,7 раза выше, чем в группе интактных крыс $[(41,0 \pm 4,3)$ Ед/л]. Введение животным препарата сравнения сопровождалось уменьшением активности указанной трансаминазы в 1,3 раза $[(53,0 \pm 6,1)$ Ед/л]. Исследуемый показатель в экспериментальной группе $[(42,8 \pm 5,4)$ Ед/л] не имел отличий от такового у интактных животных. В группе сравнения нормализация активности изучаемого аналита зафиксирована лишь на 9-е сутки наблюдения $[(41,3 \pm 5,0)$ Ед/л], тогда как активность АЛТ в контрольной группе оставалась повышенной в 1,4 раза $[(55,7 \pm 6,4)$ Ед/л] по сравнению с интактной группой. На 14-е сутки эксперимента активность АЛТ в контрольной, сравнения и экспериментальной группах составила $(43,1 \pm 5,2)$, $(43,0 \pm 4,4)$ и $(41,0 \pm 4,3)$ Ед/л соответственно и не отличалась от показателей у интактных крыс. Таким образом, к 14-м суткам наблюдения показатели активности АЛТ у животных контрольной группы возвращались к нормальным значениям.

Динамика накопления ТБК-активных продуктов в коже крыс представлена на рис. 4.

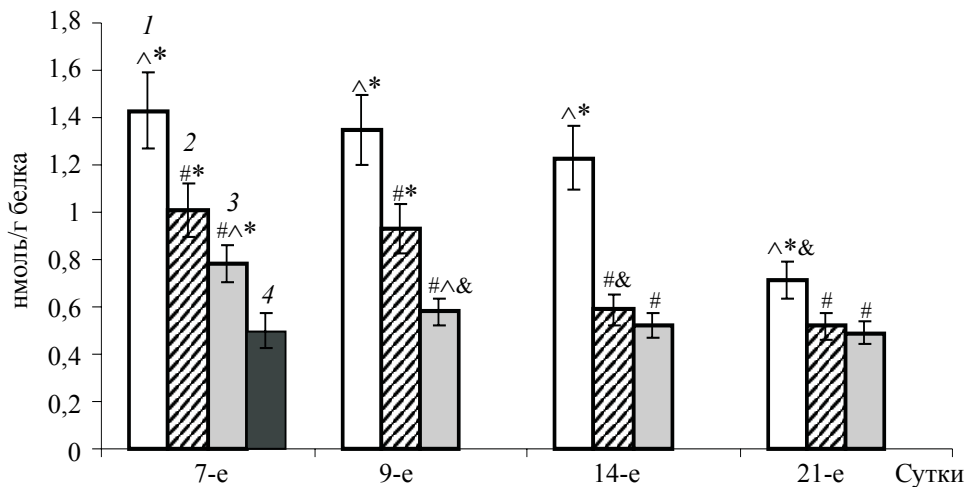


Рис. 4. Уровень ТБК-АП в коже крыс контрольной (1), сравнения (2), экспериментальной (3) и интактной (4) групп при лечении их КСКК на фоне холодовых травм. $p < 0,05$ по отношению к интактной группе*, к контрольной группе #, к группе сравнения ^, к соответствующей группе на предыдущий срок наблюдения &

Концентрация ТБК активных продуктов в коже интактных крыс составляла $(0,51 \pm 0,06)$ нмоль/г белка.

При криовоздействии на кожу крыс контрольной группы в течение седьмых суток эксперимента содержание ТБК АП в коже крыс $[(1,43 \pm 0,21)$ нмоль/г белка] увеличивается в 2,9; 1,4 и 1,8 раза по отношению к результатам, полученным в интактной, сравнения и

экспериментальной группах соответственно. В группе сравнения на фоне введения экстракта плаценты при аналогичном сроке наблюдения исследуемый показатель в коже животных $[(1,01 \pm 0,15)$ нмоль/г белка] был в 2,0 и 1,3 раза выше по отношению к результатам, полученным в интактной и экспериментальной группах соответственно, и ниже в 1,4 раза по отношению к таковым в контрольной группе. Введение КСКК животным экспериментальной группы $[(0,78 \pm 0,09)$ нмоль/г белка] способствовало увеличению уровня ТБК АП в 1,6 раза по сравнению с таковым в интактной группе и уменьшению в 1,8 и 1,3 раза по отношению к таковым в контрольной и группе сравнения соответственно.

На 9-е сутки наблюдения содержание ТБК АП в контрольной группе животных с криодеструкцией кожи $[(1,35 \pm 0,27)$ нмоль/г белка] увеличивается в 2,8; 1,5 и 2,3 раза по отношению к результатам, полученным в интактной, сравнения и экспериментальной группах соответственно. В группе сравнения на этом же сроке наблюдения исследуемый показатель в коже животных $[(0,93 \pm$

$0,10)$ нмоль/г белка] увеличивался в 1,9 и 1,6 раза соответственно по отношению к результатам, полученным в группе интактных животных и животных экспериментальной группы, и уменьшался в 1,5 раза по отношению к таковому в контрольной группе. Влияние КСКК в экспериментальной группе на 9-е сутки наблюдения $[(0,58 \pm 0,07)$ нмоль/г белка] способствовало нормализации иссле-

дуемого показателя. При этом в экспериментальной группе на фоне введения КСКК на 9-е сутки наблюдения уровень ТБК АП в коже животных $[(0,58 \pm 0,07)$ нмоль/г белка] не имел статистически значимых отличий по сравнению с результатами, полученными в интактной группе, и был ниже в 2,3 в 1,6 раза по отношению к таковым в контрольной группе и группе сравнения соответственно. В экспериментальной группе на фоне введения КСКК на этом же сроке наблюдения отмечены статистически значимые отличия по сравнению с результатами, полученными в экспериментальной группе на предыдущем сроке наблюдения (рис. 4).

Введение КСКК может, очевидно, стимулировать внутриклеточный синтез антиоксидантов, что дает возможность клетке осуществлять для энергетических целей не только внутри-, но и немитохондриальное окисление жирных кислот в процессе гамма-окисления глиоксилатного цикла.

На 14-е сутки эксперимента при введении КСКК уровень ТБК АП в коже крыс $[(0,52 \pm 0,07)$ нмоль/г белка] не имел статистически значимых отличий по сравнению с результатами, полученными в интактной группе и группе сравнения. При этом исследуемый показатель уменьшался в 2,4 раза по сравнению с результатами, полученными в контрольной группе. На 14-е сутки наблюдения в контрольной группе на фоне моделирования холодовых ран уровень ТБК АП $[(1,23 \pm 0,20)$ нмоль/г белка] в коже крыс увеличивался в 2,4 раза по сравнению с результатами, полученными в интактной, сравнения и экспериментальной группах. При аналогичном сроке наблюдения в группе сравнения были отмечены статистически значимые отличия по отношению к этой же группе на предыдущем сроке наблюдения.

На 21-е сутки наблюдения на фоне введения КСКК уровень ТБК АП в коже крыс $[(0,49 \pm 0,05)$ нмоль/г белка] не отличался от такового в интактной группе и группе сравнения, а также был в 1,5 раза ниже, чем в контрольной группе. И при этом исследуемый показатель в группе сравнения на фоне введения экстракта плаценты $[(0,52 \pm 0,06)$ нмоль/г белка] также не имел статистически значимых отличий по сравнению с результатами, полученными в интактной и экспериментальной группах, а по отношению к таковым в контрольной группе был ниже в 1,4 раза (рис. 4). На 21-е сутки эксперимента в

контрольной группе при моделировании холодовых ран уровень ТБК АП $[(0,71 \pm 0,08)$ нмоль/г белка] в коже крыс увеличивался в 1,4 раза по сравнению с его уровнем в интактной группе и группе сравнения, а также имел статистически значимые отличия от таковых на предыдущем сроке наблюдения.

У животных контрольной группы на фоне низкотемпературного повреждения кожи и, соответственно, индуцирования перекисных процессов происходит, очевидно, стимуляция фагоцитов, и генерация токсических кислородсодержащих метаболитов резко возрастает. Система нейтрофильного продуцирования оксидантов, предназначенная для локализации очага воспаления, не может противостоять реакционным радикалам. Поэтому они проникают в окружающие неповрежденные ткани и реагируют с фосфолипидами мембран и сульфгидрильными группами белков. Модификация мембраны переходит в стадию разрыхления, вызывая повышение проницаемости, что приводит к деструкции клетки.

Таким образом, определение биохимических маркеров повреждения тканей в сыворотке крови свидетельствует о более выраженном позитивном влиянии на репарацию холодовых ран КСКК по сравнению с экстрактом плаценты. Так, на 7-е сутки наблюдения введение КСКК способствовало снижению уровня ЛДГ в 1,5 раза, в то время как применение экстракта плаценты влияния не оказывало. Уровень ПОЛ при этом был в 1,8 и 1,3 раза ниже, чем в контрольной группе и группе сравнения соответственно.

На 9-е сутки активность ЛДГ в группе сравнения и экспериментальной снижалась в 1,3 и 1,9 раза соответственно, а уровень ПОЛ в экспериментальной группе нормализовался, тогда как в группе сравнения содержание ТБК АП было в 1,6 раза выше, чем в экспериментальной группе. На 14-е сутки наблюдения уровень ЛДГ у крыс в группе сравнения уменьшился в 1,5 раза, а в экспериментальной группе зафиксирована его нормализация, которая отмечается также в группе сравнения в отношении уровня ПОЛ. Уровень ТБК АП при этом в группе сравнения имеет стабильные значения, которые не отличаются от нормы так же, как и на предыдущем сроке наблюдения. Введение экстракта плаценты или КСКК приводило к уменьшению активности АСТ в 1,4 и 1,7 раза на 7-е сутки и в 1,4 и 2,2 на 9-е сутки наблюдения соответственно. На 14-е

сутки експеримента активність изучаємого аналіта в групі порівняння зменшалась в 1,4 рази, а в експериментальній групі відзначалась її нормалізація. Активність АЛТ на 7-е сутки експеримента в групі порівняння зменшалась в 1,3 рази, а в експериментальній групі досягала значень норми. В групі порівняння нормалізація активності АЛТ зафіксована лише на 9-е сутки спостереження. На 21-е сутки спостереження рівень активності ЛДГ, АСТ в сироватці крові нормалізувався во всіх досліджуваних групах, а вміст ТБК АП в шкірі мишей знаходився на рівні норми в групі порівняння і експериментальній групі.

Література

1. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. – Т. I / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.
2. Чевари С. Определение АО-параметров крови / С. Чевари, Г. Андел, Я. Штрэнгер / Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–14.
3. The effect of Antithrombin-III on routine hematological and biochemical parameters in an experimental animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury / D. Karamanos, C. Karkos, A. Kambaroudis et al. // Hippokratia. – 2014. – Vol. 18, № 3. – P. 234–239.
4. Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds / V. Lucas, R. Barrera, F. Duque et al. // Am. J. Vet. Res. – 2015. – Vol. 76, № 7. – P. 637–643.
5. Effects of DHA-rich fish oil supplementation on the lipid profile, markers of muscle damage, and neutrophil function in wheelchair basketball athletes before and after acute exercise / C.G. Marques, V.C. Santos, A.C. Levada-Pires et al. // Appl. Physiol. Nutr. Metab. – 2015. – Vol. 40, № 6. – P. 596–604.
6. Watson J.D. Biochemical markers of acute limb ischemia, rhabdomyolysis, and impact on limb salvage / J.D. Watson, S.M. Gifford, W.D. Clouse // Semin. Vasc. Surg. – 2014. – Vol. 27, № 3–4. – P. 176–181.
7. Абаев Ю.К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция / Ю.К. Абаев. – Ростов н/Д: Феникс, 2006. – 427 с.
8. Сомова Е.В. Влияние озонированных растворов на деструктивно-восстановительные процессы в коже после криоповреждения / Е.В. Сомова, Н.Г. Кадникова // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 2. – С. 65–69.
9. Раны и раневая инфекция / под ред. М.И. Кузина, Б.М. Костюченко. – М.: Медицина, 1990. – 552 с.
10. Directive 2010/63/EU of the European parliament of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. – 2010. – L. 276. – P. 33–79.

І.О. Іщенко, Л.М. Тининика, Г.О. Ковальов, І.А. Єфімова, Б.П. Сандомирський ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ СИРОВАТКИ КОРДОВОЇ КРОВІ НА БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ДЕСТРУКЦІЇ ТКАНИН

Вивчалися біохімічні маркери деструкції тканин в сироватці крові та шкірі тварин з холодowymi ранами при лікуванні кріоконсервованою сироваткою кордової крові. Показано, що введення кріоконсервованої сироватки кордової крові сприяє зниженню рівня маркерів деструкції тканин в сироватці, що проявляється в нормалізації активності АЛТ на 7-му добу експерименту, АСТ і ЛДГ на 14-ту добу. Рівень перекисного окислення ліпідів у шкірі досягає значень норми на 9-ту добу спостереження.

Ключові слова: холодові рани, маркери деструкції тканин, кріоконсервована сироватка кордової крові.

I.O. Ischenko, L.N. Tynnyka, G.A. Kovaliev, I.A. Yefimova, B.P. Sandomirsky
**EFFECT OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD SERUM ON BIOCHEMICAL MARKERS
OF DESTRUCTION OF TISSUES**

The research is devoted to the study of tissue destruction biochemical markers in blood serum and skin of the animals with cold wounds when treating them with cryopreserved cord blood serum. The introduction of cryopreserved cord blood serum has been shown to contribute to a reduction of the level of tissue destruction markers in serum, that is manifested in normalization of ALT activity to the day 7 of experiment, and to the day 14 for AST and LDH. The level of lipid peroxidation in skin reaches the normal values to the day 9 of observation.

Key words: cold wounds, tissue destruction markers, cryoreserved cord blood serum.

Поступила 13.01.16