

ментов. Поэтому ее можно использовать для кратковременного закрытия поврежденной передней отрезка глаза.

**Ключевые слова:** ксенороговица, ультраструктура, криоконсервация, лиофилизация.

temporal biological bandage to heal the wounds.

**Keywords:** xeno-cornea, ultrastructural, cryoconservation, lyophilization.

УДК 616.5-001.19:577.115:615.36

## ВПЛИВ ЕКСТРАКТІВ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ЗАГОЄННЯ ХОЛОДОВИХ РАН

~~Н.Ю. Єрмакова, А.В. Шиндер, О.Д. Рошаль, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків~~

При введенні ЕСС або ЕПБ в черевну порожнину не спостерігається активації ПОЛ в організмі щурів. Введення ЕСС або ЕПБ прискорює загоєння холодкових ран в порівнянні з контрольними групами та сприяє нормалізації рівня ПОЛ в організмі. Досліджені екстракти можуть знайти застосування при розробці препаратів для лікування ран.

**Ключові слова:** холодова рана, загоєння, екстракт селезінки, екстракт підмору бджіл.

*Робота виконана в рамках науково-дослідної теми Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України “Одержання екстрактів з кріоконсервованого ксеногенного матеріалу, їх склад та біологічна дія”, № держреєстрації 0107U000539.*

Злоякісні пухлини зовнішньої локалізації, як правило, піддаються комбінованому лікуванню (передопераційний курс хіміо- або променевої терапії з подальшим оперативним втручанням). Для видалення пухлин часто використовують кріодеструкцію, оскільки цей метод є найменш травматичним, не має протипоказань для лікування злоякісних новоутворень [8, 10]. При цьому активується перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), яке також уповільнює процес загоєння ран [7]. Таким чином, нормалізація процесу регенерації шкіри, скорочення термінів лікування після холодової травми є актуальною задачею. Сучасні засоби експериментальної і клінічної регенеративної медицини базуються як на застосуванні ствольових клітин, так і інших біологічно активних препаратів, до яких належать екстракти тканин тваринного походження [2, 9].

Раніше було показано, що екстракт кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней (ЕСС) нормалізує імунний статус організму, зокрема систему Т-лімфоцитів [2], які приймають активну участь в регуляції регенерації [4], а також що екстракт підмору бджіл (ЕПБ) має виражену антиоксидантну активність [5]. Ці факти дозволили припустити, що вказані вище екстракти сприятимуть прискоренню і нормалізації загоєння холодкових ран у тварин.

**Метою** роботи було дослідження складу ЕСС та ЕПБ та їх впливу на процес загоєння холодкових ран.

**Матеріали та методи дослідження.** Експерименти проведено відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених II Національним конгресом з біоетики і узгоджених з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Екстракт селезінки свиней одержували за методом [9], а ЕПБ - екстракцією бджолиного підмору в апараті Сокслета. Екстракти вводили щурам у черевну порожнину по 1 мл один раз на добу. Концентрація пептидів в ЕСС становила 100 мкг/мл, а в ЕПБ – 0,25 мг сухої речовини/мл. Спектри флуоресценції екстрактів досліджували за допомогою спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse. Проводилась автоматична корекція спектрів. Ширина вхідної та вихідної щілин монохроматорів становила 5 нм. Для усунення ефекту концентраційного тушіння зразки розводили так, щоб їх оптична щільність на довжині хвилі збудження не перевищувала 0,1 D. Всі вимірювання проводили при 20°C в стандартних кварцевих кюветах 1x1x3 см. Обробку спектрів проводили в програмі Microcal Origin 6.0.

Холодову травму шкіри моделювали на 18 щурах лінії Вістар і 18 щурах Сфінкс масою 190 - 210 г. Для визначення досліджуваних показників в нормі було використано по 6 тварин. Під поверхневим ефірним наркозом у дослідних щурів лінії Вістар видаляли шерсть на стегні. Холодову травму наносили охолодженим в рідкому азоті мідним аплікатором

діаметром 10 мм, експозиція становила 60 с. Щури з холодовою травмою були розділені на групи: контрольні (введення фізіологічного розчину), та дослідні (введення ЕСС або ЕПБ).

Кріодеструкцію слизової оболонки було виконано 18 щурам-самцям масою 320-350 г лінії Вістар за допомогою автономного кріоаплікатора КД-3 з мідною насадкою діаметром 2мм, що працює на рідкому азоті, час експозиції складав 60 сек. Площу ран визначали за методом [6], а інтенсивність ПОЛ -спектрофотометричним методом за рівнем ТБКАП у сироватці крові [1]. При повній епітелізації ранового дефекту вважали, що рана загоїлася. Для визначення стійкості до перекисного окислення в ячейку хемілюмінометра, яка містить 1 мл фізіологічного розчину і 100 мкл сироватки крові, додавали 200 мкл 5%-го розчину перекису водню і реєстрували світлосуму в умовних одиницях [3].

Для гістологічних досліджень фрагменти тканин фіксували в 10%-му нейтральному формаліні з подальшою заливкою в парафін. Одержані з парафінових блоків зрізи завтовшки 6-8 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином для отримання оглядових гістологічних препаратів. Для електронно-мікроскопічного дослідження шкіри або слизової оболонки використовувалися їх фрагменти, які спочатку фіксували протягом 2 год у 2%-му розчині глутарового альдегіду, відмивали фосфатним буфером і постфіксували в 1%-му розчині чотириокису осмію. Після обезводнення спиртами зростаючої концентрації шматочки тканини просочували сумішшю епон-аралдіт. Ультратонкі зрізи контрастували насиченим водним розчином ураніацетату і розчином цитрату свинцю по Рейнольдсу. Ультраструктуру тканин досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К при прискорюючій напрузі 75 кВ, забезпеченого системою знімання і аналізу зображення САІ - 01А (АО “SELM”, м. Суми на основі CCD камери DX- 2 і пакету програм фірми “KAPPA”, Німеччина).

Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом MANOVA. Кількісні дані представлені в середніх величинах і середніх квадратичних похибках.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Як видно з рис. 1, 3D-спектр ЕСС складається з двох піків складної будови. Один пік відповідає збудженню з довжиною хвилі ~ 240 нм, другий - ~ 270 нм, що характерно для ароматичних з'єднань.

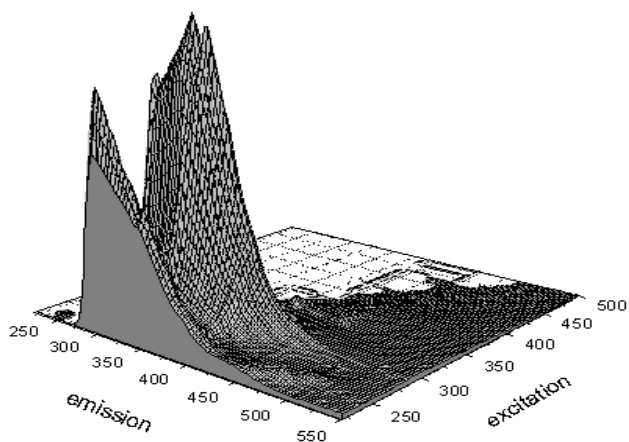


Рис. 1. 3D-спектри флуоресценції ЕСС.

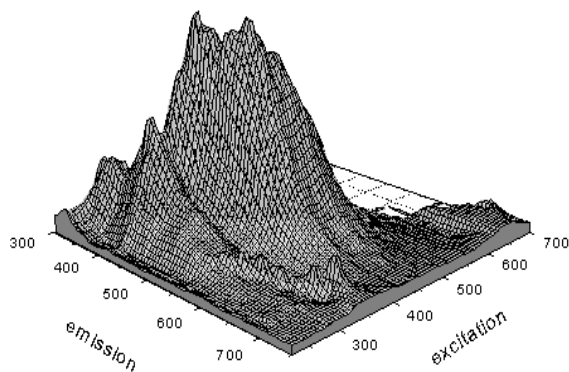


Рис. 2. 3D-спектри флуоресценції ЕПБ.

В той же час з виду спектральної кривої виходить, що збудження в обох точках приводить до появи двох близько розташованих смуг флуоресценції - короткохвильової при 310 нм і довгохвильової при 330-360 нм. Довгохвильова смуга має близько розташовані моди при 330-335 і 360-365 нм. Описана комбінація смуг збудження і флуоресценції характерна для суміші двох флуоресціюючих компонентів близької природи. Наведені дані дозволяють співвіднести описані піки з флуоресценцією амінокислот - тирозіна і триптофана. Таким чином, можна зробити висновок, ЕСС містить або вільні амінокислоти, або пептидні молекули, що містять відповідні амінокислотні залишки. У останньому випадку повинна також виявлятися флуоресценція фенілаланіна. Проте ця амінокислота має слабку інтенсивність флуоресценції, і її пік в 3D-спектрі може бути непомітним на тлі піку тирозіна.

3D-спектр флуоресценції ЕПБ був одержаний в інтервалі довжин хвиль збудження 220-700 нм, та флуоресценції 220-750 нм (рис. 2).

Він має піки, характерні для речовин рослинного походження, а в інтервалі довжин хвиль збудження 230-250 нм і флуоресценції 240-280 нм знаходиться пік, який можна

віднести до флуоресценції речовин тваринного походження. Пік з довжиною хвиль збудження 270-300 нм та флуоресценції 320-360 нм можна, як і у випадку ЕСС, віднести до флуоресценції ароматичних амінокислот, що можуть мати тваринне походження. Решта піків флуоресценції з великою ймовірністю може бути віднесена до флуоресценції флавоноїдів.

Концентрація ТБКАП в сироватці крові підвищується при різних патологічних процесах в організмі і побічно свідчить про вираженість запального процесу, який супроводжується інтенсифікацією процесу ПОЛ. Відомо також, що при імунодефіцитних станах, стресовому навантаженні та інших негативних факторах можуть виснажуватися системи контролю за рівнем інтенсивності ПОЛ [3].

При уведенні екстрактів нативним тваринам протягом 21 доби було встановлено, що вони не впливають на рівень ТБКАП в сироватці крові щурів (табл. 1). При дослідженні впливу екстрактів на інтенсивність ПОЛ в організмі щурів з холодовою травмою встановлено, що на 3-ю і 7-му добу експерименту рівень ТБКАП в сироватці крові щурів статистично достовірно перевищував цей показник у нормі майже у всіх випадках, за винятком тварин лінії Вістар, яким вводили ЕСС (табл. 2). У тварин цієї групи рівень ТБКАП в сироватці крові нормалізувався вже на 7-му добу. За всіх умов експерименту у щурів лінії Вістар статистично достовірних відмінностей в рівні ТБКАП в порівнянні з контролем не спостерігалось. У щурів Сфінкс цей показник був нижчим за контрольні значення на 7-му і 14-ту добу при введенні як ЕСС, так і ЕПБ. Такі особливості динаміки вмісту ТБКАП в сироватці крові пов'язані з тим, що при холодовій травмі у щурів Сфінкс процеси ПОЛ активізуються більше. Статистично достовірне перевищення вмісту ТБКАП у щурів Сфінкс в порівнянні з щурами лінії Вістар відмічалось до 14-ї доби експерименту як в контролі, так і при введенні ЕПБ. Більш виражена активація процесів ПОЛ у щурів Сфінкс може бути пов'язана з меншою резервною потужністю і виснаженням антиоксидантних систем при холодовій травмі.

Таблиця 1

**Рівень ТБКАП (ммоль/л) в сироватці крові щурів при уведенні екстрактів**

Строк спостереження, доба	Щури					
	Вістар			Сфінкс		
	Норма	Введення ЕСС	Введення ЕПБ	Норма	Введення ЕСС	Введення ЕПБ
3	3,01±0,35	2,99±0,25	3,11±0,30	4,95±0,41	4,55±0,43	4,65±0,51
7	2,89±0,24	2,81±0,26	2,90±0,26	4,65±0,33	4,87±0,53	4,90±0,44
14	2,76±0,25	3,07±0,29	2,84±0,29	4,55±0,40	4,63±0,55	4,72±0,46
21	3,11±0,32	2,80±0,28	3,36±0,35	4,79±0,44	4,88±0,46	4,90±0,49

Примітка: відмінності статистично недостовірні в порівнянні з нормою у всіх випадках,  $p > 0,05$

Таблиця 2

**Рівень ТБКАП (ммоль/л) в сироватці крові щурів з холодовою раною**

Строк спостереження, доба	Щури					
	Вістар			Сфінкс		
	Контроль	Введення ЕСС	Введення ЕПБ	Контроль	Введення ЕСС	Введення ЕПБ
3	6,19±0,51 <sup>1</sup>	5,41±0,37 <sup>1</sup>	5,83±0,44 <sup>1</sup>	8,48±0,64 <sup>1,3</sup>	7,40±0,56 <sup>1,3</sup>	7,93±0,59 <sup>1,3</sup>
7	5,45±0,42 <sup>1</sup>	4,20±0,32	5,48±0,4 <sup>1</sup>	9,92±0,76 <sup>1,3</sup>	6,09±0,49 <sup>1,2</sup>	7,56±0,55 <sup>1,2,3</sup>
14	4,28±0,31	4,01±0,30	4,11±0,34	7,99±0,53 <sup>1,3</sup>	5,27±0,44 <sup>2</sup>	6,18±0,43 <sup>2,3</sup>
21	4,02±0,26	3,72±0,23	4,25±0,38	5,21±0,41	4,99±0,40	5,06±0,48

Примітки: 1 – відмінності статистично достовірні в порівнянні з нормою,  $p < 0,05$ ; 2 - відмінності статистично достовірні в порівнянні з контролем (рана),  $p < 0,05$ ; 3 - відмінності статистично достовірні в порівнянні з аналогічною групою щурів лінії Вістар,  $p < 0,05$ ; рівень ТБКАП в нормі у щурів лінії Вістар - 3,98±0,25, щурів Сфінкс – 4,85±0,31.

Функціонування різних ланок антиоксидантної системи забезпечує підтримку постійного рівня продуктів ПОЛ з їх збільшенням при патологічних станах. Антиоксидантні резерви буферних систем можуть виявитися недостатніми для збереження окислювального гомеостазу. На даний час загальноприйнятим методом виявлення резервних можливостей ендогенної антиоксидантної системи є реєстрація хемілюмінесценції, індукованої перекисом водню. Світлосума хемілюмінесценції, індукованої перекисом водню, обернено пропорційна активності антиоксидантів, присутніх в системі. Світлосума хемілюмінесценції сироватки крові інтактних щурів лінії Вістар склала (127±13) ум. од., а щурів Сфінкс - (279±24) ум. од., що свідчить про меншу резервну потужність антиоксидантних систем у цих тварин.

При дослідженні площі холодкових ран шкіри при різних умовах експерименту встановлено, що на 3-ю добу експерименту відмінностей в стані і площі ран у контрольних і дослідних групах не спостерігалось. На 7-му добу у контрольних щурів Сфінкс, на відміну від щурів лінії Вістар, площа ран збільшилася, що свідчить про подальший розвиток запальної реакції і деструктивних процесів у зоні травми. У наступні терміни спостереження загоєння

ран у групі щурів Сфінкс було повільнішим. Введення щурам ЕСС або ЕПБ статистично достовірно, в порівнянні з контролем, прискорювало загоєння ран, проте і за цих умов рани у щурів Сфінкс загоювались повільніше. Найбільш виражене зменшення площі ран спостерігалось в обох дослідних групах при введенні ЕСС.

Гістологічними та електронномікроскопічними методами також було встановлено, що загоєння ран у щурів Вістар відбувається більш швидкими темпами, ніж у щурів Сфінкс. Введення ЕСС або ЕПБ прискорює регенерацію епітелія та утворення в дермі похідних шкіри в порівнянні з контрольними групами, при цьому ефективність ЕСС вища.

Морфологічні дослідження слизової оболонки рота експериментальних тварин після кріовпливу показали, що введення ЕСС або ЕПБ прискорює процеси регенерації. Генезис морфологічного відновлення структур слизової оболонки порожнини рота після кріовпливу і застосування екстрактів забезпечують більш повноцінну регенерацію. Відновлення кровопостачання тканин після кріопшкодження проявляється в розростанні капілярної мережі як в безпосередній близькості від базальної мембрани епітелію, так і в сполучнотканинних сосочках, а також в м'язових волокнах. Структура м'язових волокон власного шару ясен, в основному, відповідає нормі. Спостерігається класична картина будови елементів м'язового волокна з типовою ультраструктурою мітохондрій і міофібрил. Регенерація тканин слизової оболонки ротової порожнини при уведенні екстрактів повністю завершується до 14-ї доби спостереження без утворення грануляційної тканини, тоді як в контрольних тварин цей процес завершується до 21-ї доби.

#### **Висновок**

При введенні ЕСС або ЕПБ в черевну порожнину не спостерігається активації ПОЛ в організмі щурів. Введення ЕСС або ЕПБ прискорює загоєння холододових ран в порівнянні з контрольними групами та сприяє нормалізації рівня ПОЛ в організмі. Досліджені екстракти можуть знайти застосування при розробці препаратів для лікування ран.

**Перспективи подальших розробок у даному напрямку.** Перспективним напрямком подальших досліджень є з'ясування механізму дії екстрактів тканин тваринного походження.

#### **Література**

1. Арутюнян А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / Метод. рекомендации // А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина.-СПб.: ИКФ Фолиант, 2000. - С. 46-50.
2. Бызов В.В. Влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки на некоторые факторы местного иммунитета в комплексной терапии больных с абсцессами легких / В.В. Бызов, С.Е. Гальченко, Б.П. Сандомирский // Пробл. криобиологии. - 2001. - № 4. - С. 65-70.
3. Вавин Г.В., Бунина О.Г. Модификация хемилюминесцентного метода изучения процессов свободнорадикального окисления / Г.В. Вавин, О.Г. Бунина // Эксперимент. и клинич. фармакология.- 2002.-№ 2.- С. 63-66.
4. Донцов В.И. Регуляция лимфоцитами клеточного роста соматических тканей и новая иммунная теория старения. Обзор / В.И. Донцов // Профилактика старения. - 1998. - Вып. 1. - С. 40-63.
5. Биологическая активность экстрактов пчел в зависимости от способа получения / Н.Ю. Ермакова, Н.Г. Кадникова, А.Д. Рошаль [и др.] // Пробл. криобиологии. - 2006. - Т. 16, № 2. - С. 192-200.
6. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.-Полтава: Полімет, 2003. - 319 с.
7. Пути повышения эффективности антиоксидантной терапии у пострадавших с обширными глубокими ожогами / К.Н. Мовчан, В.Д. Хижа, И.А. Прохода [и др.] // Мед. академ. журнал. - 2007. - Т. 7, № 3. - С. 241-242.
8. Приходько С.Г. Криохирurgia злокачественных опухолей полости рта и кожи / С.Г. Приходько, В.В. Мартынюк // Стоматология. - 2001. - Т. 2. - С. 50-52.
9. Пат. 64381 А, Україна, МПК<sup>7</sup> А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко, патентовласник: ІПКіК НАН України – заявл. 22.05.2003; опубл. 16.02.2004. Бюл. № 2.
10. Kuflik E.G. Cryosurgery for skin cancer: 30-year experience and cure rates / E.G. Kuflik // Dermatol. Surg. - 2004. - Vol. 30, № 2. - P. 297 – 300.

Реферати

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ХОЛОДОВЫХ РАН**

**Ермакова Н.Ю., Шиндер А.В., Рошаль А.Д., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П.**

Установлено, что холодовые раны у крыс Сфинкс заживают медленнее, чем у крыс линии Вистар. Введение изученных экстрактов ускоряет заживление ран и снижает уровень перекисидации липидов. Они также ускоряют регенерацию эпителия и образование в дерме производных кожи по сравнению с контрольными группами, а также способствуют более раннему и полному восстановлению морфологического строения слизистой оболочки рта.

**Ключевые слова:** холодовая рана, заживление, экстракт селезенки, экстракт подмора пчел.

Стаття надійшла 28.01.10.

**EFFECT OF EXTRACTS OF ANIMAL ORIGIN ON COLD WOUND HEALING**

**Yermakova N.Yu., Shinder A.V., Roshal A.D., Galchenko S.Ye., Sandomirsky B.P.**

It has been shown that the healing of cold wounds in Sphynx rats proceeds slowly if compared with Wistar ones. The injection of the studied extracts accelerates the wound healing and reduces the level of lipid peroxidation. They also accelerate the regeneration of epithelium and formation in derma of skin derivatives if compared with the control groups as well as contribute to earlier and complete recovery of morphological structure of oral mucous structure.

**Key words:** cold wound, healing, spleen extract, dead bee bodies.

УДК 612.826:612.215

**ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС В ЛЕГЕНЯХ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ КОРОТКОЧАСНОЇ ГІПОМЕЛАТОНІЕМІЇ**

**О.М. Паричева**

*Миколаївський державний університет імені В.О. Сухомлинського, м. Миколаїв*

Десятидневное пребывание старых самцов крыс массой 320-350 г при постоянном освещении способствует снижению потенциала антиоксидантной защиты, усилению эмфизематозных изменений и перибронхиальной лимфоцитарной инфильтрации в ткани легких, появлению в эпителии бронхов единичных фигур фрагментации ядра по типу амитоза.

**Ключевые слова:** мелатонин, прооксидантно-антиоксидантная система, легкие.

*Робота виконана в рамках теми: "Органні ефекти мелатоніну" (№ держреєстрації 0109U002265)*

Мелатонін (МТ) – один з гормонів епіфізу, використовується в фармакології та медицині як регулятор сну. Він є багатифункціональним гормоном, його рецептори наявні в різних утвореннях головного мозку та в різних ендокринних органах. Завдяки високій ліпофільності він швидко проникає у різні біологічні середовища організму. Доведені багаточисельні біологічні ефекти МТ: біоритмологічний, гіпотермічний, протипухлинний, адаптогенний, антистресовий, антипроліферативний, імуномодельючий, антиоксидантний, антигеріатричний [1, 2, 6, 7, 10, 13].

МТ за рахунок гідрогену аміногрупи та ароматичного кільця має прямі антиоксидантні властивості, інактивує активні форми кисню (АФК), і посилює експресію генів антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази (СОД) та глутатіонпероксидази) [3, 20]. В легенях, де проходить обмін кисню між повітрям і кров'ю, існує великий ризик переводу кисню на АФК, тому в них є потужний антиоксидантний захист (АОЗ) [4, 12]. Крім того, легені є депо нейтрофілів для крові, тому при пневмоніях, особливо гострих, розвивається синдром перексидації, а у дітей можливий розвиток гострого респіраторного дистрес-синдрому [9].

Питання впливу МТ на прооксидантно-антиоксидантну систему (ПАС) легень у літературі підкреслено тільки з імунологічної точки зору [5, 8].

**Метою** роботи було визначення стану ПАС в легенях старих щурів при зменшенні надходження до організму МТ та порівняння отриманих даних з гістологічним оглядом.

**Матеріал та методи дослідження.** Групування дослідів включало дві групи кожна по 7 старих самців щурів лінії Вистар середньою вагою 320-350 г. Першу групу склали тварини