

Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія

С.Є. ГАЛЬЧЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

З літературних даних відомо про наявність ряду тканиноспецифічних пептидів, однією з функцій яких є регуляція проліферації клітин. Вони також можуть стимулювати процеси репарації і регенерації у відповідних органах. Причому ці пептиди є видонеспецифічними [4].

Мета роботи – визначити вплив різних режимів кріоконсервування на вихід пептидів в екстракти, дослідити їх ефективність на моделях різних патологічних станів і вплив на щурів різного віку.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження служили фрагменти селезінки, печінки та підшлункової залози статевозрілих свиней, печінки та підшлункової залози новонароджених поросят а також екстракти з них. Органи подрібнювали на фрагменти масою 1-3 мг. Як кріопротектори використовували ДМСО і ПЕО-1500 у кінцевих концентраціях 10 і 20%. Завись фрагментів розфасовували в пластикові контейнери об'ємом 1 мл і заморожували зі швидкістю 1°C/хв за допомогою програмного заморожувача УОП-6. Екстракти одержували інкубуючи фрагменти органів в фізіологічному розчині на протязі 60 хв. Концентрацію білків в екстрактах визначали за методом Лоурі, а пептидів і нуклеотидів – спектрофотометричним методом після видалення з екстрактів термолабільних білків. Для визначення молекулярно-масового розподілу пептидів в екстрактах використовували гель-проникаючу хроматографію. Екстракти, які використовувались для лікування патологічних процесів, отримували за методом, описаним в роботі [5].

Експериментальний токсичний гепатит та цироз печінки у щурів моделювали уведенням розчину тетрахлорметану, а цукровий діабет – уведенням алоксану. Опікові рани наносили мідним аплікатором з температурою 100°C. Екстракти вводили в черевну порожнину, а при лікуванні опіків підшкірно від периферії до центру рани.

Активність амінотрансфераз в крові щурів визначали по стандартній методиці з використанням наборів АО "Реагент". Інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) визначали спектрофотометрично за рівнем продуктів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБКАП) [1].

Адрес для кореспонденції: Гальченко С.Є., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Контроль ефективності екстракту селезінки свиней при лікуванні опікової рани здійснювали візуальним, планіметричним, мікробіологічним і гістологічним методами.

Для гістологічних досліджень шматочки печінки та шкіри фіксували в формаліні, заливали в парафін і готували зрізи товщиною 5 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином або по Ван-Гізону. Мікроциркуляторне русло печінки досліджували методом прижиттєвої мікроскопії.

Результати обробляли статистично за методом Стьюдента-Фішера.

Результати й обговорення

Мінімальний вихід білка в розчин спостерігається при інкубації фрагментів, які не піддавалися заморожуванню. Максимальний вихід білка в розчин із кріоконсервованих фрагментів спостерігається в тому випадку, коли заморожування проводилося в присутності 10% ДМСО, а мінімальний – у присутності ПЕО – 1500. Максимальний вихід пептидів відмічався у випадку, коли екстракт одержується із фрагментів, кріоконсервованих під захистом ПЕО–1500. Хроматографічним методом встановлено, що молекулярно-масовий розподіл пептидів в водно-сольових екстрактах кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів залежить як від органу, так і від віку тварин. Отримані дані треба мати на увазі при дослідженні механізмів тканиноспецифічної дії таких екстрактів.

Токсичне ураження печінки супроводжується порушенням біохімічних показників сироватки крові, що проявляється зокрема, в гіпертрансфераземії, обумовленої ураженням паренхіматозних клітин. Через добу після початку експерименту в сироватці крові щурів активність АлАТ збільшувалась у 18 разів, а АсАТ – у 5,6 разів у порівнянні з нормою. На п'яту добу спостереження активність обох амінотрансфераз у тварин, яким вводили екстракти печінки, хоча і вища значень, характерних для інтактних тварин, але вірогідно нижча, ніж у нелікованих тварин. Концентрація ТБКАП в печінці інтактних тварин становила $4,4 \pm 0,3$ нмоль/мг тканини. Уведення тетрахлорметану вірогідно ($p < 0,05$) збільшувало концентрацію ТБКАП в 2,1 рази у порівнянні з результатами, отриманими на інтактних тваринах, і вона залишалася незмінною у контрольних тварин протягом п'яти діб. У тварин,

яким вводили екстракти, цей показник був вірогідно менше, ніж у контрольних щурів, вже на третю добу і ще більше зменшувався на п'яту. Спостерігалась нормалізація гістологічної будови печінки у щурів, яким вводили екстракти.

При моделюванні цирозу печінки спостерігалась типова картина цього захворювання: розростання фіброзної тканини в паренхимі, вузлова перебудова. Гепатоцити в стані вираженої жирової дистрофії. Спостерігався некроз гепатоцитів групами по кілька клітин. Циротичні зміни печінки супроводжувались збільшенням активності амінотрансфераз. При цьому активність АЛАТ була вище норми в 5,4 рази, а АсАТ – в 2 рази.

На 30-ту добу спостереження зменшення проявів цирозу відмічалось в обох групах тварин, але вони відрізнялися ступенем цього зменшення. При гістологічному дослідженні у тварин, які отримували екстракти, прояви внутрішньоклітинної, клітинної та тканинної регенерації були більш вираженими, ніж у тварин, які не отримували лікування. В сполучній тканині несправжніх дольок та септ утворення капілярів відмічалось тільки у тварин, яких лікували. В цій же групі частіше зустрічались дво- та багатоядерні гепатоцити, зменшувалась кількість сполучної тканини.

Методом прижиттєвої мікроскопії було встановлено, що в другій групі щурів на 30-ту добу спостерігалось значне збільшення кількості функціонуючих судин, збільшувався діаметр синусоїдів. Швидкість кровотоку збільшувалась в 2 – 2,5 рази. В цілому картина гемоциркуляторного русла печінки в другій групі наближалась до картини, характерної для норми, хоча повного відновлення структури русла не відбувалося. В першій групі тварин нормалізація гемоциркуляції хоча і спостерігалась, але була виражена в значно меншій мірі.

Таким чином можна зробити висновок, що досліджені екстракти стимулюють репаративну регенерацію печінки при токсичному гепатиті та цирозі.

При експериментальному цукровому діабеті у щурів спостерігаються значні порушення метаболізму, які проявляються в гіперглікемії, підвищенню рівня глюкози в крові при глюкозному навантаженні та активації процесів ПОЛ в організмі. У тварин з діабетом, які не отримували лікування, рівень глюкози в крові натще на 7-у добу перевищував норму в 2,2 рази, а на 15-у добу в 3,6 рази. На 30-ту добу спостереження рівень глюкози в крові дещо зменшувався, але залишався значно вище норми. У тварин, яким вводили екстракт підшлункової залози він зменшувався і на 15-ту, і ще більше на 30-ту добу спостереження, і в цей строк перевищував норму всього в 1,3 рази. Рівень цукру в крові

тварин після глюкозного навантаження, яким вводили екстракт, також значно нижче, ніж у нелікованих тварин, особливо на 30-у добу.

У щурів з діабетом максимальна інтенсивність ПОЛ спостерігалась на 15-у добу експерименту з деяким зниженням на 30-у. При використанні для лікування екстракту спостерігається зменшення концентрації кінцевих продуктів перекисного окислення на 15-у добу спостереження, і на 30-у добу їх кількість статистично достовірно ($p < 0,05$) не відрізняється від значень, характерних для інтактних тварин.

Отже екстракт підшлункової залози сприяє зменшенню рівня глюкози в крові як натще, так і після навантаження глюкозою, а також зменшує рівень ПОЛ в організмі.

При збалансованості процесів запалення та регенерації відбувається загоєння ран з оптимальним перебігом та зміною різних етапів цього процесу. При імуносупресивному стані процеси регенерації уповільнюються, спостерігається активація запальних процесів, рани загоюються з ускладненнями [3].

Необхідність усунення вказаних порушень в системі пептидної регуляції загоєння ран дає змогу патогенетично обґрунтувати застосування в комплексі лікування ран екстракту селезінки свиней (ЕСС), який проявляє імунобіологічну дію [2].

В результаті візуального контролю стану опікових ран було встановлено, що на 1-у добу з моменту травми спостерігається значна гіперемія і набряк шкіри. На 3-ю добу відмінностей в лікованих і нелікованих ранах відмічено не було.

На 7-у добу в контрольній групі опікові рани були покриті некротизованою тканиною та фібрином, спостерігалась плазморея по всій опіковій поверхні. У тварин 2-ї групи, яким вводили екстракт селезінки, рани набули рівномірного рожевого забарвлення, грануляція розросталася на всій площі, гранулююча поверхня була гладшою. Площа опікової поверхні в контролі становила $(4,9 \pm 0,6)$ см², а у тварин, яким вводили екстракт – $(2,5 \pm 0,3)$ см². Відмінності в середніх розмірах ран статистично достовірні ($p < 0,05$).

На 14-у добу в контрольній групі тварин на опіковій поверхні зберігався важко відокремлюваний струп. В дослідній групі тварин рани практично загоїлися. Середній строк загоєння контрольних і дослідних ран становив $(23,2 \pm 2,3)$ та $(13,8 \pm 2,1)$ діб відповідно ($p < 0,05$).

Таким чином, при введенні екстракту відмічався вищий темп загоєння опікової рани, що виражалося в прискоренні зміни фаз регенераторного процесу: скорочувалися терміни періоду клітинної інфільтрації і збільшувався темп утворення грануляції.

При дослідженні гістологічних препаратів на 14-у добу в контрольній групі тварин відмічалася інфільтрація лімфо- та лейкоцитарними клітинами, спостерігалася слабо виражена судинна мережа. У дослідній групі клітинна інфільтрація була меншою, ознаки регенераторного процесу були більш виражені, центральна частина рани зайнята новоутвореною грануляційною тканиною. У глибоких шарах вже є організація сполучнотканних структур. Відбувається наростання епідермісу. У власному м'язі шкіри контури пучків збережені.

При мікробіологічному дослідженні біопатів з опікових ран, узятих на 3-ю добу, була встановлена наявність змішаної бактерійної інфекції. До складу мікробної асоціації входили 6 аеробів і факультативно-анаеробних бактерій: β -гемолітичний коагулятопозитивний *Staphylococcus epidermidis*, α -гемолітичний *Streptococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*. Титр бактерійних клітин на 1 г біоптата складав від 10^4 до 10^8 КУО. Уведення екстракту вже на 3-ю добу зумовило зменшення мікроорганізмів в рані.

На 7-у добу концентрація бактерій в рані значно знижувалася і складала в контрольній групі: *S. faecalis* – 10^2 КУО/г, *S. epidermidis* і *Proteus vulgaris* – 10^3 КУО/г, *E. coli* і *Enterobacter cloacae* – 10^2 КУО/г. В другій групі тварин відбулася ерадикація ран від усіх мікроорганізмів, за виключенням *S. epidermidis* і *Proteus vulgaris*, титр яких становив 10 КУО/г.

Отримані результати досліджень свідчать, що введення ЕСС сприяє більш швидкій ерадикації ран від патогенних і умовно патогенних бактерій.

В даний час загально визнаною є класифікація перебігу раневого процесу, в якій виділяються три фази: запальна, проліферації і реорганізації та ремоделювання рубця [3]. Запальна фаза направлена на очищення рани від нежиттєздатних тканин, продуктів їх розпаду і підготовку пошкоджених тканин до загоєння дефекту. Відмічений позитивний вплив ЕСС на процес проходження запальної фази може бути пов'язаний з тим, що він збільшує фагоцитарну активність лейкоцитів, а також нормалізує імунну відповідь як В-, так і Т-лімфоцитів [2].

Морфологічне дослідження опікових ран дозволяє зробити висновок про прискорення репаративного процесу при введенні ЕСС, який справляв помітний вплив на швидкість та якість загоєння ран.

Позитивний вплив цього екстракту, окрім нормалізації імунної відповіді, може бути пов'язаний також з тим, що велика кількість цитокінів, які приймають участь в регуляції процесів загоєння ран, продукується імунокомпетентними клітинами: макрофагами, лімфоцитами і т.д. Теоретичним

обґрунтуванням такого припущення можуть бути дані останніх років про те, що цитокіни утворюють собою загальну систему регуляції функцій клітин організму поліпептидними молекулами, контролюючи ріст, диференцію, проліферацію і функціональну активність багатьох клітин, в тому числі фібробластів, кератиноцитів, ендотеліальних клітин і т.д [6]. Виходячи з наведених вище фактів, можна припустити, що екстракт селезінки, нормалізуючи імунну систему організму, нормалізує цитокіновий профіль і таким чином сприяє більш швидкому загоєнню ран. Тим не менше, отримані дані дають можливість припустити, що цей екстракт може знайти застосування в комплексному лікуванні опікових ран.

Але вплив досліджуваного препарату на здоровий і хворий організм може розрізнятися, тому крім дослідження на моделях відповідних захворювань або патологічних станів необхідно визначити його вплив на здоровий організм.

Дослідження впливу препарату при хронічному уведенні проводили на щурах лінії Вістар починаючи з 6-місячного віку. В хронічному експерименті було використано шість груп тварин: одна контрольна і п'ять дослідних. В кожній групі спостерігали по 10 тварин. Тваринам дослідних груп вводили індивідуальні екстракти один раз на тиждень протягом шести місяців. За тваринами спостерігали протягом 1 року. Старим щурам (20 тварин) вводили по 1 мл суміші усіх екстрактів, взятих в однаковій кількості, протягом десяти днів після досягнення ними 24-місячного віку. Контрольними були 10 інтактних тварин такого ж віку.

Було встановлено, що при хронічному уведенні щурам екстрактів ксеноорганів, тварини у всіх групах не гинули, і динаміка зміни маси тварин в контрольній і дослідній групах достовірно не відрізнялася. Отже досліджені екстракти не впливають на зміну маси тварин, обумовлену фізіологічними причинами.

Концентрація ТБКАП в плазмі крові дослідних тварин статистично достовірно не відрізнялась від цього показника у контрольних тварин протягом всього строку спостереження ($p > 0,05$). Ці дані свідчать про те, що в умовах хронічного досліду екстракти органів свиней і поросят не збільшують активність процесів ПОЛ, а отже і не ініціюють ушкодження біологічних мембран клітин.

Рівень ТБКАП в крові та печінці 24-місячних щурів перевищує в 1,4 та 1,3 рази показники, характерні для 6-місячних тварин. Уведення суміші екстрактів приводить до зменшення інтенсивності ПОЛ в організмі старих щурів до рівня, який спостерігався у 6-місячних тварин. Тварини, які отримували суміш екстрактів, на 5-6-ту добу ставали більш охайними та рухливими, спосте-

рігалося загоєння ран шкіри, які були у деяких тварин. При цьому тривалість життя таких тварин збільшувалася.

Таким чином, виходячи з наведених даних, можна припустити, що досліджені екстракти стимулюють процеси фізіологічної репарації в тканинах старого організму таким же чином, як і при експериментальних патологіях. А зменшення активності ПОЛ та збільшення тривалості життя тварин є наслідком такої стимуляції. Наведені дані ми вважаємо попередніми, які можуть послужити обґрунтуванням подальших робіт в плані дослідження ефективності та механізмів дії екстрактів ксенотканин як стимуляторів процесів репарації при старінні організму та для корекції вікових патологій.

Висновки

1. Застосування кріобіологічних підходів дозволяє збільшити вихід пептидів в екстракт.

2. Молекулярно-масовий розподіл речовин пептидної природи в екстрактах залежить від органу, з якого їх отримували, і від віку тварин.

3. Отримані екстракти стимулюють процеси репарації та регенерації в ушкоджених органах.

4. Досліджені екстракти не впливають на зміну маси тварин, обумовлену фізіологічними причинами і стимулюють процеси фізіологічної репарації в тканинах старого організму.

Література

1. Арутюнян А. В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / Метод. рекомендации.– СПб.: ИКФ Фолиант, 2000.– 104 с.
2. Бызов В.В., Высеканцев И.П., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Опыт применения эндотрахеального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 87-88.
3. Даценко Б.М. Теория и практика местного лечения гнойных ран.– К.: Здоровье, 1995.– 235 с.
4. Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. эксперим. биол. и медицины.– 2001.– Т. 132, N8.– С. 228-229.
5. Пат. 64381 А Україна № 2003054649 МПК⁷ А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко; ІПКіК НАН України.– Заявл. 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004; Бюл. Промисл. власність №2.– С. 4.41.
6. Peschel C., Huber C., Aulitzky W.E. Clinical applications of cytokines // Presse Med.– 1994.– Vol.18, N23.– P.1083-1091.