

## НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТА СК

А.Я.ШУРЫГИН, М.Ю.МЫРИНОВА, Э.И.ЗЛИЩЕВА

Отдел биологически активных веществ Кубанского госуниверситета, г.Краснодар

Изучено изменение изоферментного спектра ЛДГ в динамике заживления кожных ран крыс, а также активность некоторых ферментов антиоксидантной защиты и накопление продукта ПОЛ-диеновых конъюгатов.

Установлено, что изоферментный спектр ЛДГ восстанавливается быстрее у животных, которых лечили препаратом СК. Отмечена фазность изменений активности антирадикальных ферментов и накопления ДК, при этом выявлено достоверное увеличение активности каталазы в группе, где применяли СК.

В последние годы при создании иммуномодулирующих лекарственных средств большое внимание уделяется препаратам пептидной природы [1,2].

Так, например, получена мазь, содержащая опиопептид даларгин, используемая для лечения ран [3].

В Кубанском госуниверситете разработан иммуностимулирующий препарат СК (Стимулятор Кубанский), представляющий собой смесь полипептидов с молекулярной массой от 500 до 4000 Да [4].

Многочисленные эксперименты показали, что СК повышает неспецифическую резистентность [5]. Однако, ранозаживляющее действие СК и биохимические изменения в ране под влиянием препарата ранее не изучались.

Известно, что процесс ранозаживления сопровождается глубокими изменениями углеводного обмена: начальной его фазе соответствует усиление анаэробного гликолиза, накопление молочной кислоты. Эпителизация же стимулируется повышением концентрации кислорода, являясь аэробным процессом [6]. В связи с этим нами был изучен изоферментный спектр одного из основных ферментов углеводного обмена — лактатдегидрогеназы (ЛДГ), по которому можно судить не только о топографии патологического процесса, но и о степени поражения ткани или органа [7].

Исследования многих авторов показали, что по мере развития воспалительного процесса, происходит накопление в сыворотке крови продуктов ПОЛ, обладающих способностью тормозить пролиферативные процессы [8]. В задачу нашего исследования входило определение содержания продукта перекисного окисления липидов — диеновых конъюгатов (ДК), а также активность ферментов, контролирующих процесс образования свободных радикалов — супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы при лечении ран СК.

**Методика.** Работа выполнена на 47 самцах-кроликах породы Шиншилла массой 2000-2200 г и на 58 самцах-крысах линии Вистар, массой 220-250 г. Эксперимент проводили на двух видах ран: кожных и кожно-мышечных.

Кожные линейные раны наносили крысам по методике, описанной в работе [9].

Кожно-мышечные раны кроликов  $S = 1600 \text{ мм}^2$  получали с помощью прибора, предложенного М.Г.Багдыковым [10].

Животных делили на 2 группы. Опытную — раны обрабатывали мазью, содержащей вазелин, ланолин, воду дистиллированную, СК (из расчета 24 мг на 1 г мази). В контрольной группе на рану животных наносили мазевую основу того же состава, исключая СК. Кожные раны крыс обрабатывали сразу после нанесения и далее ежедневно. Кожно-мышечные раны кроликов — через сутки после нанесения и далее через каждые 48 часов.

В динамике ранозаживления через каждые семь суток измеряли площадь поверхностей кожно-мышечных ран, вычисляли процент заживления за сутки, регистрировали сроки полной эпителизации.

На седьмые и четырнадцатые сутки после операции в сыворотке крови и в супернатанте грануляционной ткани кожно-мышечных ран кроликов обеих групп определяли активность СОД [11], содержание ДК [12]. Кроме того, в сыворотке крови — активность каталазы и пероксидазы [13, 14].

Ткань из области рубца кожных линейных ран крыс для определения изоферментного состава ЛДГ брали до начала эксперимента, на 3, 5, 7, 10-е сутки. Изоферменты ЛДГ разделяли электрофоретически в полиакриламидном геле в приборе фирмы "Ренал". Для выявления изоферментов использовали реакцию восстановления нитросинего тетразолия. Окрашивающий раствор готовили по прописи [15].

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследований показали, что местное применение СК достоверно ускоряет эпителизацию. Так, площадь раневой поверхности к седьмым суткам в контрольной группе составляла 77,5% от исходной, в то время как в опытной — 62,8%, причем различия эти носили статистически достоверный характер. Во все сроки исследования площади ран животных опытной группы были достоверно меньше, чем у контрольных кроликов. Полное заживление наступало на 14,1 суток раньше, чем в контроле. Средние темпы заживления в сутки составляли в опыте — 7,9%, в контроле — 4,9%.

Изучение изоферментного состава ЛДГ тканей послеоперационного рубца кожных ран крыс показало, что на третьи сутки наблюдалось резкое увеличение ЛДГ<sub>5</sub> в обеих группах, что свидетельствует об активации анаэробного гликолиза с быстрым превращением пивувата в молочную кислоту (табл. 1). К пятым суткам в контрольной группе животных изоферментный состав носил тот же характер "мышечного типа". В группе крыс, где применялся препарат СК, к седьмым суткам наблюдались признаки нормализации изоферментного спектра. ЛДГ<sub>5</sub> приближался к фоновым значениям и составлял  $40,7 \pm 1,8$ , что, вероятно, соответствовало фазе пролиферации, сопровождающейся развитием грануляционной ткани, прорастанием в регенерат сосудов и улучшением в результате этого снабжения тканей кислородом, угасанием анаэробного гликолиза.

На десятые сутки лечения все изоферменты ЛДГ в опытной группе достигали исходных значений, в то время как у контрольных животных увеличение ЛДГ<sub>5</sub> носило стойкий характер и даже на десятый день от начала эксперимента этот изофермент не снижался до нормальных величин. Следовательно, углеводный метаболизм в грануляционной ткани контрольных крыс протекал с накоплением лактата по анаэробному пути.

Состояние антиоксидантной системы организма оценивали по уровню активности в крови и грануляционной ткани СОД, каталазы, пероксидазы.

Таблица 1

Влияние СК на изоферментный состав лактатдегидрогеназы (в % к общей активности ЛДГ)

Сроки исследования	Группы животных*	ЛДГ <sub>5</sub>	ЛДГ <sub>4</sub>	ЛДГ <sub>3</sub>	ЛДГ <sub>2</sub>	ЛДГ <sub>1</sub>
До начала эксперимента	Контроль интактный=7	$37,5 \pm 2,4$	$30,4 \pm 1,8$	$22,2 \pm 1,4$	$7,9 \pm 1,2$	$2,0 \pm 0,3$
3 сутки	Контроль=6	$60,8 \pm 3,2^*$	$35,2 \pm 2,2$	$2,2 \pm 0,8^*$	$1,8 \pm 0,9^*$	—
	Опыт=7	$56,2 \pm 2,8^*$	$35,8 \pm 2,6$	$5,3 \pm 0,9^*$	$2,7 \pm 0,5^*$	—
5 сутки	Контроль=5	$57,1 \pm 3,4^*$	$37,1 \pm 3,2^*$	$4,2 \pm 0,7^*$	$2,0 \pm 0,6^*$	—
	Опыт=7	$49,7 \pm 1,8^{**}$	$33,9 \pm 1,2$	$12,4 \pm 1,2^{**}$	$3,4 \pm 0,9$	$0,6 \pm 0,09$
7 сутки	Контроль=7	$50,2 \pm 3,1^*$	$33,0 \pm 2,6$	$13,5 \pm 1,8^*$	$1,3 \pm 0,9$	—
	Опыт=5	$40,7 \pm 1,8^{**}$	$30,2 \pm 1,5$	$24,0 \pm 1,9^{**}$	$3,3 \pm 1,2^*$	$1,8 \pm 0,4$
10 сутки	Контроль=7	$46,2 \pm 2,1$	$32,2 \pm 2,3$	$16,5 \pm 1,8$	$4,1 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,2$
	Опыт=7	$38,1 \pm 2,7$	$30,9 \pm 1,9$	$21,5 \pm 1,7$	$6,7 \pm 1,1$	$2,8 \pm 0,1$

— количество животных

\* — различия достоверны в сравнении с контролем интактным

\*\* — различия между контролем и опытом достоверны

Как показали результаты исследования, изменение активности СОД в сыворотке крови (табл. 2) и грануляционной ткани (табл. 3) прооперированных животных носили фазовый характер.

На седьмые сутки в обеих группах происходило резкое увеличение активности СОД, что, вероятно, является следствием усиленного синтеза этого фермента в очаге воспаления за счет поступления новых клеток крови (лимфоцитов, гранулоцитов), а также выходом СОД из фагоцитированных эритроцитов и разрушенных лейкоцитов [16].

К 14-м суткам наблюдалось снижение активности СОД как в тканях, так и в сыворотке крови всех животных, что можно объяснить активным расходом фермента на утилизацию гидроперекисей. Кроме того, уменьшением поступления СОД тканей в кровь в связи с началом облитерации сосудов в ране и образованием рубцовой ткани [17].

Пероксидазная активность сыворотки крови после нанесенной операционной травмы снизилась у животных на седьмые сутки, однако, уже к следующему сроку исследования достигала величины интактного контроля практически у всех кроликов (табл. 2).

Известно, что функцией фермента каталазы является предотвращение накопления перекиси водорода, образующейся при дисмутации супероксидного аниона. В условиях нашего эксперимента, после незначительного увеличения активности каталазы на седьмые сутки в обеих группах, к четырнадцатым суткам, в группе животных, которые лечились мазью с СК, этот показатель антиоксидантной защиты достигал своей максимальной величины и достоверно превышал контрольные значения. Вероятно, это связано с переходом метаболизма на пластическое и энергетическое обеспечение клеток во время пролиферативного периода, что вызывает активное продуцирование  $O_2$  и гидроперекисей [16] снижение СОД. Антиперекисная защита, по-видимому, осуществляется за счет каталазы [18].

Нами было исследовано содержание в сыворотке крови и грануляционной ткани кроликов одного из продуктов перекисного окисления липидов — диеновых конъюгатов (ДК).

Таблица 2

Влияние СК на активность СОД, каталазы, пероксидазы, содержание ДК в сыворотке крови кроликов

Показатели	Группы животных	Сроки исследования, сутки		
		до начала эксперимента	7 сутки	14 сутки
СОД (усл. ед. в % к контролю интактному)	контр.	100±14,0 n=6	198,4±15,1 n=9	108,9 n=7
	опыт		194,3±15,7 n=7	115,6±12,0 n=8
Каталаза (мкат/л)	контр.	356,9±40,7 n=5	454,9±92,8 n=8	431,6±86,0 n=6
	опыт		489,9±85,4 n=10	647,8±92,7* ** n=6
Пероксидаза (нм/мин/л)	контр.	219,6±11,25 n=5	175,1±13,4 n=10	210,9±25,4 n=7
	опыт		179,1±23,6 n=10	210,7±17,9 n=7
ДК (усл. ед.)	контр.	2,1±0,45 n=5	3,66±0,53 n=8	2,18±0,39 n=8
	опыт		3,95±0,43 n=7	2,45±0,32 n=7

\* — достоверность различий с контролем интактным;

\*\* — достоверность различий с контролем;

n — количество животных.

Мы отмечали достоверное повышение их на седьмые сутки и далее снижение до фоновых значений к четырнадцатым суткам после операции как в контроле, так и в опыте (табл. 2).



Таблица 3

Влияние СК на активность СОД и содержание ДК в грануляционной ткани кожно-мышечных ран кроликов

Сроки исследования, сутки	СОД (усл. ед. в% к контролю интактному)		ДК (усл. ед.)	
	контроль	опыт	контроль	опыт
До начала эксперимента	100±13,9 n=5		18,75±1,97 n=5	
7	281,52±1,3*	319,6±23,9* n=6	23,32±2,28* n=6	12,25±0,68** n=7
14	122,8±15,4 n=8	120,2±19,7 n=8	45,32±5,2 n=7	27,96±5,8 n=7

\* — достоверность различий с контролем интактным;

\*\* — достоверность различий с контролем;

n — количество животных.

Иную картину наблюдали при изучении ДК в послеоперационной ткани (табл. 3). Так, уровень ДК в опытной группе животных в первый срок исследования уменьшался в сравнении с фоновым значением, к четырнадцатым суткам он повышался и был достоверно выше, чем в контроле интактном. В контрольной группе происходило накопление этого продукта ПОЛ, и уже к седьмым суткам содержание ДК было достоверно выше, чем у интактных и опытных кроликов. К четырнадцатому дню после начала эксперимента ДК в контроле достигали максимального значения (45,32±5,25) и превышал этот показатель в опытной группе в 1,6 раза. Таким образом содержание ДК зависело от стадии раневого процесса и накоплении их в контрольной группе было выражено сильнее.

Анализ данных свидетельствует о том, что местное применение мази, содержащей препарат СК, приводит к более интенсивному формированию грануляционной ткани, ускорению темпов эпителизации, что значительно (в среднем на 14 сутки) сокращает сроки заживления.

Более благоприятное течение раневого процесса в группе животных, леченых СК, подтверждается достоверным опережением восстановления изоферментного состава ЛДГ в сравнении с контролем.

В результате проведенных исследований отмечена фазность изменений активности антиоксидантных ферментов и накопления ДК.

Установлено также, что применение препарата СК для лечения кожно-мышечных ран в эксперименте значительно снижает накопление ДК в грануляционной ткани животных, не оказывает отрицательного влияния на такие изученные ферменты антиоксидантной системы как СОД, пероксидаза, способствует повышению активности каталазы в сыворотке крови.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П. // Пат. физиол. и эксперим. терапия. — 1982. — N 4. — С. 13-25.
2. Мануйлов Б.М., Цыпин А.Б., Онищенко Н.А. // Иммунология. — 1995. — N 4. — С. 24-27.
3. Шехтер А.Б., Соловьева А.И., Спивак С.Е. и др. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1988. — N 10. — С. 87-89.
4. А.с. N 1295557 СССР. Способ получения пептидной фракции кумыса, обладающей иммунозаживляющим действием // Шурыгин А.Я., Злищева Э.И., Сеничева М.И., 1986.
5. Злищева Э.И., Кирилличева Г.Б., Шурыгин А.Я. и др. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1993. — N 3. — С. 278-279.
6. Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция. — М., 1990.
7. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. — М., 1983.
8. Арюхин И.А., Белый В.Я., Вагнер В.К. Воспаление как общебиологическая реакция. — Ленинград. — 1989.
9. Коллагеноластика в медицине. Под ред. В.В.Ковалева, И.А.Сыренкова. — М., 1978.
10. Багдыков М.Г. Применение новых инструментов и приборов нашей конструкции в хирургии // В сб. Методы физико-химического анализа. — Ростов-на-Дону, 1975.
11. Мхитарян В.Г., Арапьян А.А., Микасян Э.М. и др. // Экспериментальная и клиническая медицина. — 1977. — Т. 7. — Вып. 5. — С. 13-18.
12. Гаврилова Б.В. // Лаб. дело. — 1988. — N 2. — С. 60-63.
13. Королюк М.А., Иванова А.И., Майорова И.Г. и др. // Лаб. дело. — 1988. — N 1. — С. 16-18.
14. Попов Т., Нейковская Л.И. // Гигиена и санитария. — 1971. — N 10. — С. 89-91.
15. Волгин В.П., Блинова Т.В. // Лабораторное дело. — 1971. — N 1. — С. 16-17.
16. Гусев В.А., Панченко Л.Ф. // Вопр. мед. химии. — 1982. — N 4. — С. 3-24.
17. Шехтер А.Б., Серов В.В. Соединительная ткань. — М., 1981.
18. Владимиров Ю.А., Арчаков А.Н. Перекисное окисление липидов. — М., 1972.

## SOME BIOCHEMICAL INDEXES OF WOUND PROCESS UNDER THE ACTION OF PREPARATION SK

*A.I.Shurigin, M.Y.Mirinova, I.I.Zlistcheva*

Kubansky State University Krasnodar The Department of Bioogaly Active Substance

There was investigated that the change of izoenzyme spectrum of laktatdegidrogenaze (LDG) in the dynamic of rats skin wounds healing, and also the activity of some antioxidative enzymes and the accumulation of one lipid peroxidation product (LJO).

It was discoved that the enzyme spectrum LDG was reconstructed faster with treted animals by SK preparation. The phase of antioxidative enzymes activity and accumulation of some LFO products were reconized. SQ, the increasing of the katalaza activity in group, where the SK was used.