

УДК: 541.49; 615.015:615.05; 616.24; 616-0.01.17.0.01.08

А.О. Очеретнюк, А.В. Мельник**БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФІБРОГЕНЕЗУ ТА ПОШКОДЖЕННЯ ЛЕГЕНЕВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ З ОПІКОВОЮ ТРАВМОЮ ШКІРИ І НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ ІНФУЗІЙНИХ РОЗЧИНІВ ЛАКТОПРОТЕЇНУ З СОРБІТОЛОМ ТА HAES-LX-5%***Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова*

Очеретнюк А.О., Мельник А.В. Біохімічні маркери фіброгенезу та пошкодження легеневої тканини у щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі застосування інфузійних розчинів лактопротеїну з сорбітолом та HAES-LX-5% // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 59-61.

В роботі показано, що за умов опікової хвороби, особливо на 3 добу, проходить ремоделювання сполучної тканини та активуються процеси окисного пошкодження фосфоліпидного бішару легень. Введення колоїдно-гіперосмолярного розчину - HAES-LX-5% та розчину лактопротеїну з сорбітолом щурам з опіковою травмою шкіри справляє антифіброгенну дію, а також зменшує виразність окисної деградації мембранних фосфоліпідів, при чому їх протекторна дія найбільш виразна на 7 добу експерименту.

Ключові слова: інфузійна терапія, фіброгенез, фосфоліпіди, HAES-LX-5%, лактопротеїн з сорбітолом.

Очеретнюк А.О., Мельник А.В. Биохимические маркеры фиброгенеза и повреждения легочной ткани у крыс с ожоговой травмой кожи и на фоне применения инфузионных растворов лактопротеина с сорбитолом и HAES-LX -5 % // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 59-61.

В работе показано, что при ожоговой болезни, особенно на 3 сутки, происходит ремоделирование соединительной ткани и активируются процессы окислительное повреждение фосфолипидного бислоя легких. Введение крысам с ожоговой травмой кожи коллоидно-гиперосмолярного раствора - HAES-LX-5 % и раствора лактопротеина с сорбитолом оказывает антифиброгенное действие, а также уменьшают выраженность окислительной дегградации мембранных фосфолипидов, причем их протекторное действие максимально на 7 сутки эксперимента.

Ключевые слова: инфузионная терапия, фиброгенез, фосфолипиды, HAES-LX -5 %, лактопротеин с сорбитолом.

Ocheretnyuk A.O., Melnik A.V. Fibrogenesis and damage lung tissue biochemical markers in rats with skin burns that undergo infusion of lactoprotein solution with sorbitol and HAES-LX- 5% // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 2. – С. 59-61.

It is shown that in a case of burn disease, especially on day 3, remodeling of connective tissue and oxidative damage phospholipid lungs takes place. Infusion of colloidal hyperosmolar solution - HAES-LX-5% and lactoprotein solution with sorbitol equally causes antifibrogenic effect and reduces the severity of oxidative degradation of membrane phospholipids in rats with skin burns. Their protective effect is the most expressive on day 7 of the experiment.

Key words: infusion therapy, fibrogenesis, phospholipids, HAES-LX-5%, lactoprotein with sorbitol.

Опікова травма шкіри є важливою проблемою сьогодення через велику розповсюдженість, високу летальність, складність патогенезу та лікування [2]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, термічні ураження займають третє місце в загальній структурі травматизму. Щорічно в розвинених країнах реєструється 290-300 опіків на 100 тис. населення. Загальна летальність від опіків у світі коливається в межах 0,6-5 % [8].

Тригерними механізмами альтерації легеневої тканини за умов опікової травми шкіри є розвиток оксидативного стресу, який супроводжується накопиченням продуктів окисної модифікації ліпідів та руйнуванням клітинних мембран [5, 6]. Поряд з цим реєструється ремоделювання сполучної тканини, активуються процеси фіброгенезу в тканинах легень. Цілком очевидно, що ефективність потенційних коректорів функціонального стану легень значною мірою визначається їх здатністю стримувати накопичення реакцієздатних вільних радикалів, зменшувати ураження біліпідного шару клітинних мембран, а також виявляти депримуєчий вплив щодо процесів фіброгенезу в тканині легень.

Метою дослідження було оцінити вплив інфузійних розчинів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом (референс-препарат) на мар-

кери фіброгенезу, деструкції сполучної тканини та фосфоліпідний спектр клітин легень у щурів з опіковою травмою шкіри.

Матеріал та методи. Експериментальні дослідження виконані на 32 білих нелінійних щурах-самцях масою 160-180 г., які було отримано із віварію Інституту фармакології та токсикології АМН України. Дослідження проводили в лабораторії кафедри фармакології ВНМУ, сертифікованої ДФЦ МОЗУ (посвідчення №000679 від 11.01.2008р.). Тварини були розподілені на групи по 8 щурів у кожній: I – щурі, яким проводили катеризацію стегнової вени без опіку (тварини без опіку); II – щурі з опіком та встановленим катетером у стегновій вені, яким проводилась внутрішньовенна інфузія 0,9 % розчином NaCl протягом 5-6 хв у дозі 10 мл/кг. Опіковий шок викликали шляхом прикладання 4-ох мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом 6 хв у воді з постійною температурою 100°C. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складає 21-23 % при експозиції 10 с, що є достатнім для формування опіку III ступеня та розвитку шокового стану середнього ступеня важкості [7]; III – щурі з опіком та встановленим катетером у стегновій вені, яким проводилась внутрішньовенна інфузія розчином лактопротеїну з

сорбітолом протягом 5-6 хв у дозі 10 мл/кг/добу або IV - розчином НАЕС-LX-5% у тій же дозі у нижню порожнисту вену. Введення інфузійних розчинів здійснювали через 1 год після моделювання патологічного стану, а потім 1 раз на добу протягом 7 діб. Катетеризацію магістральних судин здійснювали в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг в/в). Тварин виводили із дослідів (на 1, 3 та 7 добу експерименту) шляхом декапітації в результаті передозування ефіру.

Біохімічні дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідчення про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.). Сироватку крові виділяли за стандартною методикою [3]. Гомогенати легень отримували після відокремлення крупних бронхів та трахеї, тканини гомогенізували в скляному гомогенізаторі з тefлоновим pestиком при 3000 об/хв 5 хвилин в 0,154 М розчині хлориду калію у ваговому співвідношенні 1:3, центрифугували при 600 g протягом 30 хвилин, супернатант використовували для біохімічних досліджень.

В сироватці крові визначали вміст маркерів деградації сполучної тканини та фіброгенезу (вільного оксипроліну, трансформуючого фактору росту - $\beta 1$). В гомогенаті легень визначали вміст фосфатидилхоліну та лізофосфатидилхоліну. Вміст трансформуючого фактору росту - бета 1 (ТФР- $\beta 1$) визначали за набором «TGF- $\beta 1$ » (Biosource, Europe S.A.), рівень вільного оксипроліну - за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом [4].

Фосфоліпідний спектр визначали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Л5/40 (Chemapol, Чехія). Фракції фосфоліпідів розділяли в системі хлороформ-метанол-вода у співвідношенні 65:30:5 (за об'ємом). Ідентифікацію окремих фосфоліпідів (фосфатидилхоліну, лізофосфатидилхоліну) проводили методом свідків після їх хроматографічного розділення [1]. Кількісне ви-

значення фракцій фосфоліпідів після хроматографії проводили за реакцією з фосфорнованіліновим реактивом [3].

Результати дослідження та їх обговорення.

Опікова травма шкіри супроводжувалась зміною фосфоліпідного спектру клітинних мембран легеневої тканини, порушення мембранної проникності та транспорту речовин (табл. 1). Встановлено, що в легенях щурів відмічалось зниження вмісту фосфатидилхоліну (на 35,4% - на 1 добу; на 46,9% - на 3 добу; на 40,1% - на 7 добу) на тлі зростання рівня його окисненої форми - лізофосфатидилхоліну (на 33,8% - на 1 добу; на 65,5% - на 3 добу; на 50,8% - на 7 добу), відносно інтактних щурів. За цих умов виявлялось падіння співвідношення рівнів фосфатидилхоліну до лізофосфатидилхоліну (на 51,9% - на 1 добу; на 68,0% - на 3 добу; на 60,4% - на 7 добу), порівняно з таким в групі тварин без опікової хвороби шкіри.

Інфузійна терапія розчинами досліджуваних речовин зменшувало дисбаланс між окремими фосфоліпідами, індукований опіковою травмою шкіри (табл. 1). Так, застосування розчинів НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом протягом 1 доби не справляло достовірного впливу на вказані показники, тоді як починаючи з 3 доби супроводжувалося відповідно зростанням вмісту фосфатидилхоліну (відповідно на 16,2 та 14,1%), зменшенням рівня лізофосфатидилхоліну (відповідно на 17,0 та 15,1%) та збільшенням співвідношення цих фосфоліпідів (відповідно на 40,6 та 35,5%), порівняно з контролем. Введення вказаних препаратів протягом 7 діб мало найбільший коригуючий вплив щодо порушень фосфоліпідного спектру: зростання вмісту фосфатидилхоліну становило відповідно 23,1 та 18,7%, зменшення рівня лізофосфатидилхоліну - відповідно 21,2 та 19,9%, а збільшення співвідношення вказаних фосфоліпідів - відповідно 61,4 та 52,1%, відносно таких показників у контрольній групі тварин.

Таблиця 1. Вміст фосфатидилхоліну, лізофосфатидилхоліну та їх співвідношення в постядерному супернатанті гомогенату легень у щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі фармакотерапії ($M \pm m$, $n=8$)

Характеристика груп тварин		ФХ, мкмоль/г сухої тканини	ЛФХ, мкмоль/г сухої тканини	ФХ/ЛФХ
Інтактні тварини (без опікової травми шкіри)		17,9 \pm 0,44	0,813 \pm 0,021	22,1 \pm 0,80
Опікова травма+0,9%NaCl (контроль)	1 доба	11,5 \pm 0,42*	1,09 \pm 0,02*	10,6 \pm 0,37*
	3 доба	9,49 \pm 0,32*°	1,35 \pm 0,03*°	7,06 \pm 0,22*°
	7 доба	10,7 \pm 0,36*&	1,20 \pm 0,03*&	8,70 \pm 0,24*&
Опікова травма+ НАЕС-LX-5%	1 доба	12,1 \pm 0,60*	0,960 \pm 0,020*	12,6 \pm 0,59*#
	3 доба	11,0 \pm 0,42*#	1,10 \pm 0,04*#°	9,90 \pm 0,35*#°
	7 доба	13,2 \pm 0,56*#&	0,970 \pm 0,060*#&	14,1 \pm 1,20*#&
Опікова травма+ Лактопротеїн з сорбітолом	1 доба	12,1 \pm 0,49*	0,970 \pm 0,030*	12,6 \pm 0,70*
	3 доба	10,8 \pm 0,34*#°	1,14 \pm 0,050*#°	9,60 \pm 0,44*#°
	7 доба	12,7 \pm 0,66*#&	0,980 \pm 0,060*#&	13,3 \pm 1,14*#&

Примітки: тут і в подальшому: 1. * - $p < 0,05$ відносно показників у інтактних тварин; 2. # - $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі; 3. ° - $p < 0,05$ між показниками на 1 та 3 добу експерименту в межах однієї групи; 4. & - $p < 0,05$ між показниками на 3 та 7 добу експерименту в межах однієї групи; 5. ФХ - фосфатидилхолін; 6. ЛФХ - лізофосфатидилхолін.

Аналіз маркерів ремоделювання сполучної тканини та фіброгенезу показав, що опікова травма шкіри викликала істотні зміни у складі легневих біополімерів (табл. 2). В сироватці крові відмічалось статистично вірогідне зростання вмісту

вільного оксипроліну (на 59,5% - на 1 добу; на 97,4% - на 3 добу; на 70,0% - на 7 добу) та трансформуючого фактору росту ТФР- $\beta 1$ (на 57,8% - на 1 добу; на 137% - на 3 добу; на 116% - на 7 добу), відносно інтактної групи тварин.

Таблиця 2. Вміст маркерів деструкції сполучної тканини та фіброгенезу в сироватці крові щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі фармакотерапії ($M \pm m$, $n=8$)

Характеристика груп тварин		Вільний оксипролін, мкмоль/л	ТФР- $\beta 1$, пг/мл
Інтактні тварини (без опікової травми шкіри)		25,2 \pm 2,42	121 \pm 4,82
Опікова травма+0,9%NaCl (контроль)	1 доба	40,2 \pm 1,06*	191 \pm 11,5*
	3 доба	49,8 \pm 1,49* ^o	287 \pm 9,64* ^o
	7 доба	42,9 \pm 1,74* ^{&}	261 \pm 6,24* ^{&}
Опікова травма+ HAES-LX-5%	1 доба	37,0 \pm 2,04*	165 \pm 9,15*
	3 доба	41,8 \pm 2,38* [#]	220 \pm 5,62* ^{#o}
	7 доба	32,3 \pm 1,35* ^{#&}	169 \pm 9,10* ^{#&}
Опікова травма+ Лактопротеїн з сорбітолом	1 доба	36,4 \pm 2,04*	167 \pm 3,82*
	3 доба	42,9 \pm 2,18* ^{#o}	231 \pm 2,49* ^{#o}
	7 доба	33,7 \pm 1,16* ^{#&}	172 \pm 7,12* ^{#&}

Фармакотерапія опікової травми шкіри розчинами HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом до певної міри попереджало ремоделювання сполучної тканини та фіброгенез. Зокрема, станом на 3 добу введення досліджуваних препаратів супроводжувалося зменшенням в сироватці крові вмісту вільного оксипроліну (відповідно на 16,2 та 13,9%) та трансформуючого фактору росту ТФР- $\beta 1$ (відповідно на 23,5 та 19,3%), порівняно з контролем. В той же час на 7 добу експерименту антифіброгенна активність розчинів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом була найбільшою: зменшення вмісту в сироватці крові вільного оксипроліну становило відповідно 24,7 та 21,4%, а трансформуючого фактору росту ТФР- $\beta 1$ - відповідно 35,2 та 34,0%, порівняно з контрольною групою тварин.

Таким чином опікова травма шкіри викликає різноманітні біохімічні та патофізіологічні зрушення в організмі щурів в цілому та легеневій тканині зокрема. Наші дослідження показали, що опікова хвороба супроводжується порушенням фосфоліпідного спектру тканин легень, що проявлялось зменшенням вмісту фосфатидилхоліну та зростанням продукту його окиснення – лізофосфатидилхоліну. Ковалентна модифікація фосфоліпідів мембран за опікової хвороби веде до порушення проникності клітинних мембран та розладів в роботі клітинних насосів, які необхідні для транспорту речовин та створення градієнту концентрації йонів по обидві сторони від мембрани клітин. Поряд з вказаними змінами за опікової хвороби проходять ремоделювання сполучної тканини та активуються процеси фіброгенезу, про що доказово свідчило зростання в сироватці крові вільного оксипроліну та трансформуючого фактору росту ТФР- $\beta 1$.

Фармакологічна корекція опікової хвороби з допомогою розчинів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом до певної міри нормалізувало співвідношення фосфатидилхоліну / лізофосфатидилхоліну в клітинних мембранах легеневої тканини та запобігало ремоделюванню сполучної тканини та активзації фіброгенезу. За вказаними ефектами HAES-LX-5% не поступався референт-препарату - лактопротеїну з сорбітолом.

Висновки: 1. Опікова травма шкіри у щурів супроводжується розвитком дисбалансу фосфоліпідів легень (вміст фосфатидилхоліну зменшується на 35-47%, а рівень лізофосфатидилхоліну зро-

стає на 34-66%), зростанням вмісту в сироватці крові маркерів деструкції сполучної тканини (вільного оксипроліну – на 60-97%) та фіброгенезу (ТФР- $\beta 1$ – на 58-137%).

2. Застосування колоїдно-осмотичного розчину HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом стримувало розвиток ремоделювання сполучної тканини, процеси фіброгенезу та окисного пошкодження фосфоліпідного біпару легень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 126-135 с.
2. Козинець Г.П. Опікова хвороба / Г.П. Козинець, О.Н. Коваленко, С.В. Слесаренко // Журн. сучасного лікаря. Мистецтво лікування. – 2006. – № 12. – С. 9-12.
3. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
4. Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови / П.Н. Шараев, Е.П. Сахабутдинова, О.И. Лекомцева, С.В. Кошикова // Клин. лабор. диагностика. – 2009. – № 1. – С. 7-9.
5. Придруга С.М. Патогенетичні механізми пошкодження органів у різні періоди травматичної хвороби / С.М. Придруга, Н.В. Гасюк // Світ медицини та біології. – 2012. – №2 (8). – С. 194-200.
6. Сухомлин Т.А. Процеси перекисного окиснення ліпідів у легенях щурів за умов опікової хвороби та їх корекція препаратом «ліпін» / Т.А. Сухомлин // Актуальні проблеми сучасної медицини: вісник української медичної стоматологічної академії. – 2013. – № 4 (44). – С. 187-190.
7. Gunas I. Method of thermal burn trauma correction by means of cryoinfluence / I. Gunas, I. Dovgan, O. Masur // Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. 92. In Olsztyn vom 24. Bis 27. Mai 1997: bipartitemeeting / zusammen mit der Polish Anatomical Society with the participation of the Association des Anatomistes. – 1997. – P. 105.
8. Disturbances of electrolytes in severe thermal burns / M.L. Hauhouot Attooungbre, W.C. Mian, N.A. Edjeme [et al] // Ann. Biol. Clin. (Paris). – 2005. – Vol. 63, №4. – P. 417-421.

Надійшло 19.02.2014 р.

Рецензент: проф. А.Д.Савенко