

**В. О. Костенко, О. І. Цебржинський**

## **Продукція супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту у тканині нирок після хірургічного втручання**

*В эксперименте на белых крысах изучали генерацию супероксидного анион-радикала (митохондриальной и микросомальной электронно-транспортными цепями, а также при реализации дыхательного взрыва лейкоцитов) и оксида азота (NO) в ткани почек, защитой после нефротомии простым и хромированным кетгутом, биофилом (из твердой оболочки спинного мозга крупного рогатого скота), дексоном II (полигликолевой кислотой) и биофилом, модифицированным биологически активными веществами (БАВ) — этонием, сукцинатом, мексидолом. Установлено, что применение простого и хромированного кетгута провоцирует развитие длительного окислительного стресса, что проявляется в повышении продукции супероксидного анион-радикала и NO, способных оказывать цитотоксическое действие. Риск развития длительного окислительного стресса значительно снижается при применении биофила, модифицированного указанными БАВ. При этом, в более ранние сроки нормализуется продукция супероксидного анион-радикала микросомальной и митохондриальной электронно-транспортными цепями, а на 14-е сутки послеоперационного периода при применении нитей, модифицированных сукцинатом и мексидолом, вклад дыхательного взрыва лейкоцитов и генерации NO в развитие окислительного стресса значительно ниже, чем при использовании традиционного кетгута.*

### **Вступ**

Процеси вільнорадикального окиснення (ВРО) мають важливе значення у механізмі біодеградації резорбтивних шовних матеріалів (РШМ) біологічного та синтетичного походження [15]. Окрім цього, активація ВРО є одним із факторів патогенезу запалення [5], розвиток якого часто відзначається після нанесення операційної травми та імплантації хірургічної нитки [11]. Надмірна активація ВРО, пов'язана з перебільшенням продукції активованих кисневих метаболітів (АКМ —  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\cdot\text{RO}_2$  тощо) внаслідок підвищення їх утворення або виснаження антиоксидантів, супроводжується активацією деструктивних процесів і має назву «окиснювальний стрес» [9]. Висока інтенсивність останнього пригнічує процеси клітинної проліферації [2], що має істотне значення у порушенні загоювання операційної рани. Оксид азоту (NO), крім того, вважається хімічним індикатором запалення [13]. Представляє інтерес визначення джерел генерації АКМ залежно від виду РШМ, що застосовуються для зшивання тканини нирок після її пошкодження, в тому числі розроблених з нашою участю хірургічних ниток, модифікованих біологічно активними сполуками (етонієм, сукцинатом, мексидолом). Антиоксидантні властивості останніх наведені у літературі [3, 4, 7, 10].

© В. О. Костенко, О. І. Цебржинський

Метою дослідження було вивчення рівня продукції супероксидного аніон-радикала (мітохондріальним і мікосомальним електронно-транспортними ланцюгами, а також при дихальному вибуху лейкоцитів) та оксиду азоту у тканині нирок білих щурів, яка зшита після нефротомії різними РШМ.

## Методика

Дослідження (8 серій) проведено на 128 білих щурах лінії Вістар різної статі, масою 180–250 г. Тваринам під кетаміновим наркозом (1 мг/кг) здійснювали стандартний розріз у межах кіркового шару нирок з наступним накладанням вузлових швів. У I серії дослідів (контрольній) проводили всі етапи операції без нефротомії та імплантації нитки. У II серії як РШМ застосовували кетгут полірований (традиційний шовний матеріал з баранячої сировини), виготовлений КП «Полтавський м'ясокомбінат»; у III – хромований кетгут, виготовлений ВО «Татхімфармпрепарати» (Казань, Росія), у IV – синтетичний РШМ «дексон II» (полігліколева кислота з полікапролатним покриттям) фірми «Davis & Geck» (США); у V – нитку «біофіл» з твердої мозкової оболонки великої рогатої худоби (КП «Полтавський м'ясокомбінат»), у VI – біофіл, модифікований за заводських умов (КП «Полтавський м'ясокомбінат») розчином етонію (1,2-етилен-біс(N-диметилкарбдецилоксиметил) – амонію дихлориду), у VII – біофіл, модифікований розчином сукцинату, у VIII – біофіл, модифікований розчином мексидолу (3-окси-6-метил-2-етилпіридину сукцинату).

Через 7 і 14 діб після імплантації РШМ щурів декапітували під легким ефірним наркозом. Джерела супероксидного аніон-радикала оцінювали в тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ) [6] у гомогенаті тканини з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН і бактеріальними ліпополісахаридами. Для цього 0,1 г тканини гомогенізували зі скляним порошком у 0,9 мл ізотонічного (рН 7,4) фосфатного буферу. Відбирали по 0,05 мл гомогенату в 4 пробірки та перемішували: 1) 0,05 мл буферного розчину (для визначення загальної фонові нестимульованої активності); 2) 0,05 мл 3%-го розчину НАДФН (для оцінки продукції супероксидного аніон-радикала мікосомальним електронно-транспортним ланцюгом); 3) 0,05 мл 3%-го розчину НАДН (для оцінки продукції супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом); 4) 0,05 мл тритону X-100 до кінцевої концентрації 0,1%, збовтували 2 хв. Перемішували та преінкубували при 37 °С: 10 хв пробірки 2 і 3, 30 хв пробірки 1 та 4. У пробірку 4 додавали 0,1 мл ампульного препарату бактеріального ліпополісахариду (продигіозан) для оцінки продукції супероксидного аніон-радикала фагоцитами). Після цього, добавили по 0,05 мл 0,2% НСТ на буфері, перемішували. Інкубували при 37 °С: пробірки 1 та 4 – 30 хв, 2 і 3 – 5 хв. Додавали 2,0 мл розчинника (хлороформ – диметилсульфоксид у співвідношенні 1 : 2 за об'ємом) та взбовтували протягом 1 хв. Центрифугували 5 хв при 1500 об/хв. Відбирали забарвлений супернатант. Фотометрію 1,0 мл верхнього шару проводили проти відповідного контролю при довжині хвилі 540 нм на мікроФЕК МКМФ-1 з ходом променя 0,5 см та об'ємом 1 мл. Контроль: набирали у 4 пробірки 0,05 мл буферу, 0,05 мл води та 0,05 мл НСТ і додавали у пробірки: 1) 0,05 мл води; 2) 0,05 мл

НАДФН; 3) 0,05 мл НАДН; 4) 0,05 мл тритону X-10 і 0,1 мл продигіозану. Інкубували також 10 і 30 хв при 37 °С і елюювали забарвлення. Самі НАДФН, НАДН, продигіозан не відновлюють НСТ. Оскільки за реакцією 1 моль НСТ відновлюється 2 молями супероксидного аніон-радикала, то для розрахунків робили стандартний графік за екстинцією диформазау (0,01–0,2 мл 0,2% НСТ відновлювали сумішшю 0,1 мл 0,1 моль/л КОН і 0,1 мл розчину аскорбінової кислоти (18 мг/10 мл). Інкубували, диформазау елюювали 2 мл розчинника та фотометрували. Враховуючи розведення, співвідношення компонентів за реакцією екстинцію стандарта за графіком проводили розрахунок:

$$\text{для 1 і 4: } E \times 11,11 = \text{нмоль } \cdot \text{O}_2^- / \text{г} \cdot \text{с}$$

$$\text{для 2 і 3: } E \times 66,67 = \text{нмоль } \cdot \text{O}_2^- / \text{г} \cdot \text{с}$$

Про утворення NO судили за результатами оцінки спектрів ЕПР динітрозильних комплексів заліза, які вважаються «депо» оксиду азоту, за допомогою радіоспектрометра АЕ-4700 (Україна) при значенні фактора  $g = 2,03$  у зразках тканини, охолодженої до температури 77 К [1].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням критерію  $t$  Стьюдента.

### Результати та їх обговорення

Через 7 діб після операції відзначається підвищення загальної фонові нестимульованої генерації супероксидного аніон-радикала у зшитій тканині нирок (табл. 1) при використанні всіх застосованих РШМ, окрім нитки з

**Таблиця 1. Продукція супероксидного аніон-радикала (нмоль/мг·с) у тканині нирок білих щурів після імплантації різних резорбтивних шовних матеріалів (РШМ)**

Умова досліджу	Без стимуляції	Стимуляція активності		
		НАДФН	НАДН	Продигіозан
Через 7 діб				
Без імплантації кетгуту	0,68±0,04	16,53±1,07	17,87±0,93	0,78±0,06
Після імплантації кетгуту	1,05±0,04*	24,19±1,2*	27,07±1,15*	1,14±0,07*
хромованого кетгуту	1,01±0,04*	22,42±1,17*	25,63±1,14*	1,04±0,07*
дексону II	0,86±0,05**	21,76±1,46*	25,11±1,44*	0,98±0,04*
біофілу				
немодифікованого	0,95±0,08*	22,05±2,29*	25,08±2,22*	1,05±0,09*
модифікованого етонієм	0,94±0,08*	18,27±1,32**	21,17±1,20***	1,29±0,06*
модифікованого сукцинатом	0,96±0,12*	19,34±1,98	21,1±1,82**	0,94±0,09
модифікованого мексидолом	0,75±0,04**	18,32±1,57**	20,18 ±1,62**	0,98±0,05*
Через 14 діб				
Без імплантації кетгуту	0,62±0,04	16,47±1,09	18,12±1,01	0,71±0,06
Після імплантації кетгуту	1,11±0,07*	23,69±2,13*	26,69±2,05*	1,22±0,12*
хромованого кетгуту	0,96±0,08*	22,08±1,15*	32,14±0,93***	1,08±0,11*
дексону II	0,77±0,10**	18,89±2,78	22,15±2,78	0,88±0,16
біофілу				
немодифікованого	0,72±0,05**	18,24±1,41	19,12±1,26**	0,84±0,08**
модифікованого етонієм	0,76±0,07**	17,23±1,89**	20,07±2,12**	0,93±0,12
модифікованого сукцинатом	0,64±0,06**	17,31±2,12	18,92 ±1,76**	0,74±0,04**
модифікованого мексидолом	0,60±0,04**	16,59±1,23**	15,93±1,24**	0,75±0,06**

Тут і в табл. 2. \*  $P < 0,05$  порівняно з результатами серії, де РШМ не застосовували; \*\*  $P < 0,05$  порівняно з результатами у тварин, яким був імплантований кетгут.

твердої мозкової оболонки (біофілу), модифікованої мексидолом. В останньому випадку загальний фон утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  не відрізняється від результатів контрольної серії та є достовірно нижчим від значень серій, в яких застосовували як стандартний кетгут (на 28,6%), так і немодифікований біофіл (на 21,1%). Відомо, що вказаний період дослідження припадає на фазу запалення раневого процесу [11], для якої характерним є підвищення генерації АКМ [9]. Зниження утворення останніх при застосуванні модифікованої мексидолом нитки можна пов'язати з більш значними порівняно з етонієм і сукцинатом антиоксидантними властивостями; мексидол має більшу ніж янтарна кислота проникність через біологічні мембрани [8].

При застосуванні синтетичного РШМ «дексон II» загальний фон супероксидного аніон-радикала достовірно нижчий від результатів контрольної серії, проте на 18,1% перевищує значення II серії. Це, очевидно, пов'язане з тим, що ВРО відводиться велика роль у процесі біодеградації РШМ біологічного походження, проте резорбція полігліколевої кислоти проходить, головним чином, за допомогою гідролізу, при цьому відзначається підвищення активності оксидоредуктаз макрофагів при порівняно незначній активності фагоцитів [16].

При стимуляції НАДФН-активності утворення АКМ на 7-му добу після операційного періоду при застосуванні всіх РШМ, за винятком модифікованого біологічно активними речовинами біофілу, відзначається підвищення генерації супероксидного аніон-радикала мікросомальним електронно-транспортним ланцюгом, що також притаманно розвитку запалення [9]. При імплантації нитки, модифікованої етонієм і мексидолом, генерація вказаного АКМ на 24,5 та 24,3% відповідно нижча порівняно з результатами серії, в якій використовували простий кетгут.

Продукція  $\cdot\text{O}_2^-$  мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (при стимуляції НАДН) також перевищувала результати контрольної серії при імплантації всіх РШМ, за винятком ниток, модифікованих сукцинатом і мексидолом. Останні речовини, як відомо, підсилюють альтернативні НАДН-оксидазному шляху окиснення компенсаторні метаболічні шляхи утворення АТФ і підвищують ефективність процесу мітохондріального окиснення та фосфорилування [8]. Одержані нами результати свідчать про обмеження при застосуванні РШМ, модифікованих вказаними сукцинат-вмісними сполуками, утворення АКМ при функціонуванні дихального ланцюга. При використанні біофілу, модифікованого етонієм, генерація супероксидного аніон-радикала перевищує значення контрольної серії, проте достовірно нижче порівняно з стандартним кетгутом.

Продукція АКМ на 7-му добу післяопераційного періоду фагоцитами під час дихального вибуху лейкоцитів, що спостерігається в патогенезі запального процесу, достовірно перевищує значення I серії при застосуванні всіх досліджуваних РШМ. Деяку тенденцію до збільшення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , яка відбувається при імплантації нитки, модифікованої етонієм, можна пов'язати зі здатністю останньої підвищувати активність та інтенсивність фагоцитозу, відзначалося *in vitro* [10]. Відомо, що процеси фагоцитозу та продукція лейкоцитами біологічно активних сполук мають велике значення в процесі резорбції колагенової структури біологічних РШМ [14], не

виключена їхня роль і у біодеградації хірургічних ниток — полімерів гліколевої та молочної кислот [15].

Для фази запалення раневого процесу характерним є збільшення ендогенного синтезу оксиду азоту [13]. Підвищення вмісту динітротризолного комплексу (ДНКЗ) на 7-му добу післяопераційного періоду відзначається при імплантації всіх досліджуваних РШМ (табл. 2), проте при застосуванні біофілу та його модифікованого мексидолом варіанту така тенденція є не достовірною.

**Таблиця 2. Рівень динітрозильних комплексів заліза в тканині нирок білих щурів після імплантації різних резорбтивних шовних матеріалів (M±m)**

Умова досліджу	Площа піків спектрів ЕПР (мм <sup>2</sup> )	
	Через 7 діб	Через 14 діб
Без імплантації	6,5±0,8	6,1±0,9
Після імплантації		
кетгуту	10,1±0,7*	9,4±0,7*
хромованого кетгуту	9,0±0,6*	9,2±0,8*
дексону II	8,9±0,7*	8,1±0,5
біофілу		
немодифікованого	8,7±0,7	7,4±0,8
модифікованого етонієм	9,1±0,6*	7,9±0,9
модифікованого сукцинатом	8,9±0,6*	7,2±0,6**
модифікованого мексидолом	8,5±0,5	6,4±0,6**

Через 14 діб після операції підвищений загальний фон продукції супероксидного аніон-радикала (на 79,0 та 54,8 % відповідно) залишається в серіях, де застосовували стандартний і хромований кетгут (див. табл. 1). При цьому в серіях, в яких проводилась імплантація дексону II, біофілу та ниток, модифікованих біологічно активними речовинами, загальний фон продукції  $\cdot\text{O}_2^-$  достовірно менший порівняно зі значеннями II серії.

При стимуляції НАДФН-активності утворення АКМ на 14-ту добу післяопераційного періоду при застосуванні стандартного та хромованого кетгуту продукція супероксидного аніон-радикала мікросомальним електронно-транспортним ланцюгом залишається підвищеною (на 43,8 та 34,1 % відповідно) щодо значень контрольної групи. Достовірна різниця між результатами II та інших серій відзначається при застосуванні РШМ, модифікованих етонієм і мексидолом, при цьому стимульована НАДФН продукція  $\cdot\text{O}_2^-$  є меншою на 27,3 та 30,0% відповідно.

Продукція супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (при стимуляції НАДН) також перевищує значення контрольної серії при імплантації стандартного та хромованого кетгуту (на 47,3 та 77,4 % відповідно), при цьому генерація  $\cdot\text{O}_2^-$  при застосуванні останнього РШМ достовірно (на 20,4 %) нижче від відповідного значення II серії. Це свідчить про те, що при імплантації хромованого кетгуту утворення АКМ перебільшує таке при застосуванні звичайного кетгуту. При використанні біофілу та РШМ, модифікованих біологічно активними речовинами, продукція супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом є достовірно меншою порівняно з результатами II серії.

Генерація АКМ на 14-ту добу післяопераційного періоду фагоцитами в результаті дихального вибуху залишається підвищеною при застосуванні стандартного та хромованого кетгуту (на 71,8 та 52,1 % відповідно), що вказує на значну активність запального процесу. При імплантації біофілу та його варіанту, модифікованого мексидолом, цей показник перевищує результати II серії на 31,1 та 38,5 %.

Вміст ДНКЗ, який залежить від активності NO-синтази, на 14-ту добу післяопераційного періоду (див. табл. 2) також перевищує значення контрольної серії при застосуванні звичайного та хромованого кетгуту (на 54,1 та 50,8 % відповідно). Підвищення вмісту NO та супероксидного аніон-радикала створює можливість утворення при їх взаємодії значної кількості пероксинітриду [12], який є високотоксичним прооксидантом і здатний призводити до пошкоджень структури нуклеїнових кислот і пригнічувати мітохондріальне окиснення [17], що негативно позначається на процесах репаративної регенерації. При застосуванні РШМ, модифікованих сукцинатом і мексидолом, у цей період рівень NO є достовірно меншим порівняно з результатами II серії (на 23,4 та 31,9 % відповідно), що означає зменшення ризику пошкодження біополімерів цитотоксичними сполуками, в тому числі високоактивним пероксинітридом.

Таким чином, використання звичайного та хромованого кетгуту для шва нирок після нефротомії призводить до розвитку найбільш тривалого окиснювального стресу, що проявляється у підвищеній продукції активних кисневих метаболітів, зокрема супероксидного аніон-радикала та оксиду азота, і може зумовлювати надмірні цитотоксичні ефекти. Ризик тривалого окиснювального стресу значно знижується при застосуванні біофілу, модифікованого біологічно активними речовинами (етонієм, сукцинатом, мексидолом). При цьому у більш ранній термін нормалізуються процеси продукції супероксидного аніон-радикала мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами, а на 14-ту добу післяопераційного періоду при застосуванні ниток, модифікованих сукцинатом та його похідним мексидолом, знижується (порівняно з застосуванням кетгуту) внесок дихального вибуху лейкоцитів і генерації NO у розвиток окиснювального стресу.

**V. A. Kostenko, O. I. Tsebrzhinskiy**

### **PRODUCTION OF SUPEROXIDE ANION RADICAL AND NITRIC OXIDE IN KIDNEYS TISSUE SUTURED WITH DIFFERENT SURGICAL SUTURE MATERIALS**

The generation of superoxide anion radicals (in mitochondria, microsomes and under respiratory burst of leucocytes) and nitric oxide (NO) in renal tissue has been studied in the experiment with white rats, which had been carried out nephrotomy with following usage for suture such absorbable surgical threads as plain and chromic catgut, biofil (of dura mater spinalis of the cattle), Dexon II (polyglycolic acid) and biofil modified with aethonium, succinate and mexidol. The research proves the use of plain and chromic catgut leads to the development longer oxidative stress with increasing of cytotoxic agents production (superoxide anion and NO). The risk of longitudinal oxidative stress decreases under the use of biofil suture modified with biological active compounds (aethonium, succinate and mexidol). In this case, the

generation of superoxide anion radicals in mitochondria and microsomes is normalised earlier. The superoxide generation with respiratory burst of leucocytes and NO production decreases in 14 day of postoperative period under the use of biofil suture modified with succinate and mexidol.

*Medical Stomatological Academy*

*Ministry of Public Health of Ukraine, Poltava*

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. *Варич В.Я., Ванін А.Ф., Овсянникова Л.М.* Обнаружение эндогенной окиси азота в печени мышей методом электронного парамагнитного резонанса // *Биофизика.* — 1987. — 32. Вып.6. — С.1062-1063.
2. *Воспаление: Руководство для врачей /* Под ред. В.В.Серова и В.С.Паукова. — М.: Медицина, 1995. — 640 с.
3. *Девяткина Т.А., Коваленко Э.Г., Смирнов Л.Д.* Влияние мексидола на развитие экспериментального перекисного атероартериосклероза // *Эксперим. и клин. фармакология.* — 1993. — №1. — С.33-35.
4. *Иванян А.А., Олтаржевская Н.Д., Толстых М.П., Жинко Ю.Н.* Новые покрытия с антиоксидантной активностью в лечении гнойных ран. — В кн.: *Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов: Материалы III Международ. конф. (26-27 мая 1998 г.)* — М., 1998. — С.66-67.
5. *Клименко М.О.* Загальна патологія запалення: напрямки роз витку та актуальні методологічні питання // *Фізіол. журн.* — 1998. — **44**, №4. — С.82.
6. *Коган А.Х., Грачев С.В., Елисеєва С.В., Бывевич С.* Свойство углекислого газа ингибировать генерацию супероксидного анионрадикала клетками и его биологическое значение // *Вопр. мед. химии.* — 1997. — №1. — С.193-200.
7. *Кондрашова М.Н.* Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии. — В кн.: *Фармакологическая коррекция гипоксического состояния /* Под ред. Л.Д. Лукьяновой. — М., 1989. — С.51-66.
8. *Лукьянова Л.Д.* Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 1997. — **124**, №9. — С.244-254.
9. *Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К.* Окислительный стресс при воспалении // *Усп. совр. биологии.* — 1997. — Вып.2. — С.155-171.
10. *Писько Г.Т., Василюк В.Н.* Экспериментальное изучение и клиническое применение этония // *Врачеб. дело.* — 1989, №5. — С.94-97.
11. *Скрипников Н.С., Бабанин А.А., Коротко А.Ш. и др.* Экспериментально-морфологическая оценка новой хирургической нити «биофил» при урологических операциях // *Архив клин. и эксперим. медицины.* — 1998. — **7**, №2. Прил. — С.98-102.
12. *Соловйов А.І.* Фізіологія та патофізіологічні механізми дії оксиду азоту та пероксинітриту // *Фізіол. журн.* — 1998. — **44**, №3. — С.117-118.
13. *Cattell V., Jansen A.* Inducible nitric oxide synthase in inflammation // *Histochem. J.* — 1995. — **27**, №10. — P.777-784.
14. *Okada T., Hayashi T., Ikada Y.* Degradation of collagen suture in vitro and in vivo // *Biomaterials.* — 1992. — **13**, № 7. — P. 448-454.
15. *Salthouse T.N.* Some aspects of macrophage behavior at the implant interface // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1984. — **18**, №4. — P.395-401.
16. *Salthouse T.N., Matlaga B.F.* Polyglactin 910 suture absorption and the role of cellular enzymes // *Surg. Gynecol. Obstet.* — 1976. — **142**, №4. — P.544-550.
17. *Szabo C., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A.L.* DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1996. — **93**, №5. — P.1753-1758.

*Укр. мед. стомат. академія  
М-ва охорони здоров'я України, Полтава*

*Матеріал надійшов  
до редакції 7.07.98*