

## Екстракт хоріону – відновлювач біохімічних показників крові щурів з експериментальною опіковою хворобою

Н.П. СУБОТА, І.М. ШЕРБАК

Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С.Сковороди

## Chorion Extract as a Recovering Agent for Blood Biochemical Indices in Rats with Experimental Burns

N.P. SUBBOTA, I.M. SCHERBAK

Kharkiv National Pedagogical University named after G.S. Skovoroda

Вивчали динаміку вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та активність антиокислювальної системи (активність ферментів СОД, каталази) у сироватці крові при комбінованому застосуванні екстракту хоріону (ЕХ) (внутрішньом'язове введення та біопов'язка) у щурів з експериментальною опіковою хворобою (ЕОХ). Встановлено зменшення вмісту ТБК-активних продуктів і підвищення активності ферментів (СОД і каталази) у сироватці крові щурів з ЕОХ, що призвело до підвищення антиокислювального індексу (АОІ).

**Ключові слова:** перекисне окислення ліпідів, каталаза, СОД, екстракт хоріону, опікова хвороба.

Изучали динамику содержания продуктов перекисного окисления липидов и активность антиокислительной системы (активность ферментов СОД, каталазы) в сыворотке крови при комбинированном использовании экстракта хориона (ЭХ) (внутримышечное введение и биоповязка) у крыс с экспериментальной ожоговой болезнью. Установлены уменьшение содержания ТБК-активных продуктов и повышение активности ферментов (СОД и каталазы) в сыворотке крови крыс с экспериментальной ожоговой болезнью, что привело к повышению антиокислительного индекса.

**Ключевые слова:** перекисное окисление липидов, каталаза, СОД, экстракт хориона, ожоговая болезнь.

There was studied the content of lipid peroxidation products (diene conjugates and malone dialdehyde) as well as antioxidant system activity (SOD, catalase activity) in blood serum at a combined chorion extract application (intramuscular injection+ biobandage) in rats with experimental burns. There was found the fall in TBA-active products content and increase in enzymes activity (SOD and catalase) in blood serum of rats with experimental burns, that resulted in antioxidant index rise.

**Key-words:** lipid peroxidation, catalase, SOD, chorion extract, burns.

Пошук нових ефективних методів лікування опікової хвороби – одна із актуальних задач медицини, біології, фармакології. В останні десятиріччя інтенсивно досліджується вплив препаратів, отриманих із клітин і тварин ранніх термінів розвитку, на репараційні процеси в організмі людини. Доведено, що вони є ефективними при лікуванні запальних процесів, гепатаргій, патології нервової тканини та ін. [1, 7, 9]. Вивчали властивості препаратів, отриманих із плаценти та її предтечі – хоріону [4].

Патогенетичним фактором для ряду захворювань є надмірна активація процесів ПОЛ при порушенні балансу між інтенсивністю дії прооксидантних факторів і потужністю антиоксидантної системи клітини [2].

Мета роботи – дослідження впливу загальної та місцевої дії екстракту, отриманого із хоріону людини 8-10 тижнів гестації зародка (аборти за соціальними показниками), на перебіг ЕОХ згідно з даними активності процесів ПОЛ та антиокислювальної системи (АОС).

**Адреса для кореспонденції:** Субота Н.П., Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С. Сковороди, вул. Блюхера, 2, м. Харків, Україна 61168; тел.: +380 (572) 68-42-34.

Search for novel methods effective for treating burns is known to be one of actual problems in current medicine, biology and pharmacology. During recent decades there has been intensely studied the effect of preparations procured from cells and tissues of various gestation terms on reparative processes in a human organism. They were proved effective when treating inflammatory processes, hepatargies, neural tissue pathology etc. [1, 7, 9]. There were studied the properties of preparations obtained from placenta and chorion as its precursor [4].

Excessive LPO processes activation during the intensity imbalance of pro-oxidative factors effect and the strength of an cell antioxidative system [2] is known to be the pathogenetic factor for a number of pathologies.

The objective of this study was investigating the general and local effects of extract obtained from human embryos of 8-10 gestation weeks (abortions on social indications) on the course of experimental burns, according to the data of LPO processes and antioxidant system (AOS) effects.

**Address for correspondence:** Subbota N.P., Kharkiv National Pedagogical University named after G.S. Skovoroda, Ukraine 61168, Kharkov, 2, Blyukhera str.; tel.: +380 572 684234.

## Матеріали та методи

Для проведення досліджень використовували білих безпородних щурів масою 200 - 220 г. Опікову хворобу (III А-Б ступеня) моделювали нанесенням опіку на епільовану задню кінцівку щурів, які знаходились під ефірним наркозом, після чого визначали площу ураження [5]. Екстракт хоріону застосовували внутрішньом'язово (1,0 мл) [8]; контрольним тваринам вводили 1,0 мл фізіологічного розчину, а також комбіновано – внутрішньом'язове введення + біопов'язка. Біопов'язку, просочену екстрактом, накладали на ділянку опіку і змінювали кожену добу.

Контроль досліджених параметрів проводили у динаміці через 1-6-12 год і через 1-3-5-7 діб. У сироватці крові експериментальних тварин визначали рівень дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) [3].

Активність антиокислювальних ферментів вивчали кінетичними методами. Активність каталази досліджували за [4]. В основі методу лежить здатність перекису водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 410 нм проти контрольної проби, до якої замість перекису водню додавали 2,0 мл води. Супероксиддисмутазу (СОД) активність визначали фотометричним вимірюванням швидкості інгібування ферменту при аутоокисленні адреналіну [3].

Для розрахунку АОІ (збалансованість процесів ПОЛ і АОС) використовували формулу:

$$AOI = COI \times \text{каталазу} / \text{ДК} \times \text{МДА}$$

Статистичну обробку результатів досліджень проводили параметричним методом з використанням t-критерію Стьюдента [10] на ЕОМ IBM AT 486. Для розрахунків застосовували комп'ютерну програму Excel (Microsoft, USA).

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з правилами "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що застосовуються в експериментальних та інших дослідних цілях" (Страсбург, 1985).

## Результати і обговорення

Вміст як первинних, так і вторинних ТБК-активних продуктів збільшувався, починаючи з 3-ї години після моделювання опікової хвороби (рис. 1). Максимальні показники вмісту ДК були зареєстровані після 24-х годин дослідження і утримувались на цьому рівні до 7-ї доби, в кінці спостережень зменшувались на 19%. Вміст МДА досягав максимальних показників на 12-у годину після моделювання ЕОХ і утримувався на цьому

## Materials and methods

For our research 105 white breedless rats of 200-220 g weight were used. Burn disease (III A-B degree) was modeled by performing the burn onto epilated low extremity of rats being under ether narcosis, afterwards the damaged area was determined [5]. Chorion extract was intramuscularly used (1.0 ml) [8]; control group animals were injected with 1.0 ml of physiological solution as well as in combination: intramuscularly injection plus biobandage. Biobandage moistened with extract was laid on burn site and changed each 24 hrs.

Control of the parameters studied was done in dynamics by 1-6-12 hours and in 1-3-5-7 days. In blood serum of experimental animals there were determined the levels of diene conjugates (DC) and malone dialdehyde (MDA) [3].

Antioxidant enzymes activity was evaluated using kinetic methods. Catalase activity was studied as mentioned in the paper [4]. The method is based on the capability of hydrogen peroxide to form stable stained complex with molybdenum salts. Staining intensity was measured with SP-46 spectrophotometer at a 410 nm wave length versus control sample, which was added with 2.0 of water instead of hydrogen peroxide.

Superoxidedismutase (SOD) activity was photometrically measured by evaluating the enzyme inhibition rate at autooxidation of adrenaline [3].

To calculate the antioxidant index (AOI), which is the balance of LPO and AOS processes [6] we used the formula:

$$AOI = SOD \times \text{catalase} / DC \times MDA$$

The investigation results were statistically processed by parametric method using Student's t-criterion [10]. For calculations we used Excel software (Microsoft, USA).

All the manipulations with animals were done in accordance with the European convention on protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1985).

## Results and discussion

Content of both initial and secondary TBA-active products was noted to increase starting from the 3<sup>rd</sup> hour of burn modeling (Fig. 1). Maximum DC content values were recorded in 24-hours of experiment which were kept at this level up to the 7<sup>th</sup> day and finally decreased by 19%. MDA content reached its maximum values by the 12<sup>th</sup> hour after EB modeling and remained at this high level (3 times higher than the control) for 12 hours more, then decreased nearly down to the values obtained in 6 hours.

Experimental burn caused the changes in SOD activity values: starting from the 6<sup>th</sup> hour it gradually

високому рівні (у 3 рази вище контролю) ще 12 год, після чого зменшувався майже до рівня показників, отриманих через 6 год.

Експериментальна опікова хвороба призводила до змін показників активності СОД: починаючи з 6-ї години, вона поступово зменшувалась у динаміці з  $2,12 \pm 0,023$  до  $1,01 \pm 0,041$  на 7-у добу дослідження, що складало 47,6% від вихідних. При цьому показники каталази, починаючи з 6-ї години від моделювання ЕОХ, зменшувались у 1,5 рази і залишались на цьому рівні першу добу, після чого дещо збільшувались (контрольна точка 24 год) і знову зменшувались, починаючи з 3-ї доби, а на 7-му добу складала 60% від контролю. Динаміка показників АОІ була така: через 6 год дослідження він зменшувався у порівнянні з вихідним у 2,7 рази, через 12 год після моделювання – у 8 разів, через добу – у 6 разів і утримувався на цьому рівні ще 3 доби. На 5-у добу від моделювання опікової хвороби вимірювані показники АОІ незначно підвищувались, а в кінці дослідження були у 10 разів меншими за початкові.

Комбіноване застосування ЕХ (внутрішньо-м'язове введення+біопов'язка) призводило до незначного зменшення рівня вмісту ДК у всіх контрольних точках першої доби досліджень (рис. 1). На 3-ю добу показники вмісту ДК не відрізнялися від тих, що були отримані у групі щурів без застосування препаратів. Ці показники утримувались до 5-ї доби спостережень. Починаючи з 5-ї доби і до кінця спостережень, їх рівень був нижчим, ніж у групі щурів без введення ЕХ. Вміст МДА при застосуванні препаратів у комбінованому вигляді у перші 6 год не відрізнявся від отриманих у групі щурів, яким не застосовували

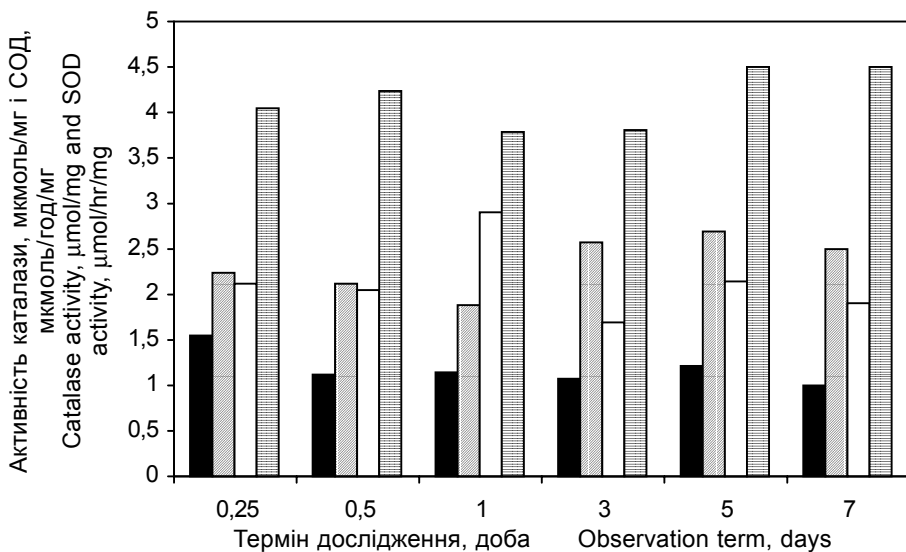


Рис. 2. Показники активності ферментів при ЕОХ: ■ – СОД; □ – каталази та комбінованому застосуванні ЕХ: □ – СОД; ▨ – каталази.

Fig. 2. Enzymes activity indices at EB: ■ – SOD, □ – catalase and at a combined CE application □ – SOD; ▨ – catalase.

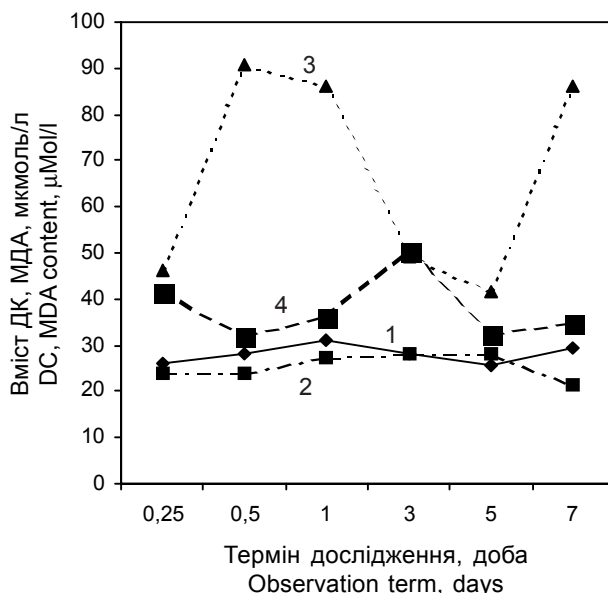


Рис. 1. Показники вмісту продуктів ПОЛ у щурів з ЕОХ (ДК – 1, МДА – 3) та при комбінованому застосуванні ЕХ (ДК – 2, МДА – 4).

Fig. 1. Indices for LPO products content in rats with experimental burns (DC – 1, MDA – 3) and at a combined CE application (DC – 2, MDA – 4).

decreased in dynamics  $2.12 \pm 0.023$  to  $1.01 \pm 0.041$  by the 7<sup>th</sup> day of experiment, that made 47.6% of initial value. Catalase indices starting from the 6<sup>th</sup> hour of burn modeling were noted to decrease in 1.5 times and remained at the same level during the first day, slightly increased afterwards (24 hours as the control point) and decreased again starting from the 3<sup>rd</sup> day, while by the 7<sup>th</sup> day it made 60% of the control. Dynamics of AOI was as follows: in 6 hours of experiment it 2.7 times decreased comparing to the initial one, by 12 hours after modeling it 8 times decreased, in a day it was 6 times

lower and remained at this level for 3 days more, by the 5<sup>th</sup> day of burn modeling AOI values slightly increased, which by the end of experiment were 10 times lower than the initial ones.

Combined use of ChE (intramuscular injection+biobandage) resulted in a slight fall of DC level in all the control points of the 1<sup>st</sup> experiment day (Fig. 1). By the 3<sup>rd</sup> day DC values showed no difference from those obtained in rat group without using the preparations. The values remained unchanged up to the 5<sup>th</sup> day of observation. Starting from the 5<sup>th</sup> day and upto the end of observation their level was lower than in rat's group with no ChE injection. MDA

препарат, а через 12 год був майже в 3 рази меншим, ніж у групі щурів без введення препарату ( $32,02 \pm 0,053$  проти  $90,65 \pm 0,09$ ). Через 24 год спостережень вміст МДА не змінювався, на 3-у добу не відрізнявся від показників у групі щурів без введення препарату, а на 5-у добу – від контрольних показників.

Активність СОД при комбінованому застосуванні ЕХ збільшувалась через 6 год дослідження у 1,5 рази, утримуючись на цьому рівні ще 12 год, і рівень показників 1-ї доби не відрізнявся від отриманих у контрольній групі (рис.2). Починаючи з 3-ї доби, показники СОД в динаміці поступово збільшувались і були вищими, ніж у групі щурів, яким препарат не вводили: у 2,37 рази – через 3 доби, у 2,2 рази – через 5 днів, у 2,5 рази – на 7-му добу. Комбіноване застосування препарату збільшувало активність каталази, починаючи з 6-ї години дослідження у 2 рази в порівнянні з показниками у групі щурів без введення ЕХ. Показники утримувалися на цьому рівні у всі наступні терміни дослідження. На 7-му добу вони були у 2,4 рази вищі, ніж у групі тварин без введення препарату, і у 1,4 рази вищі у порівнянні з отриманими у групі контрольних тварин (рис.2).

Аналіз результатів визначення АОІ свідчить, що комбіноване застосування препаратів дозволяло збільшити досліджуваний показник у 3 рази вже через 6 год експерименту, а через добу він був у 6 разів вищим, через 3 доби – у 5 разів, через 5 днів – у 5,6 рази, на 7-у добу – у 24 рази.

Таким чином, якщо на 7-му добу в групі тварин без введення препарату АОІ зменшився в 10 разів у порівнянні з групою контрольних тварин, то при поєднаному застосуванні препарату він був у 1,95 разів вищим (рис. 3).

## Висновки

Отримані дані дають можливість зробити висновок про високу ефективність комбінованого використання ЕХ: внутрішньом'язове введення та біопов'язка. Дана методика може бути запропонована для подальшої розробки, більш поглибленого вивчення і аналізу з метою експериментального обґрунтування її клінічного застосування.

## Література

1. Бехтерева Н.П., Гилерович Е.Г., Гурчик Ф.А. О трансплантации эмбриональных нервных тканей в лечении паркинсонизма // Журн. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1990. – Т. 90, №11. – С. 10-13.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Т. 2. – Минск, 2000. – 463 с.

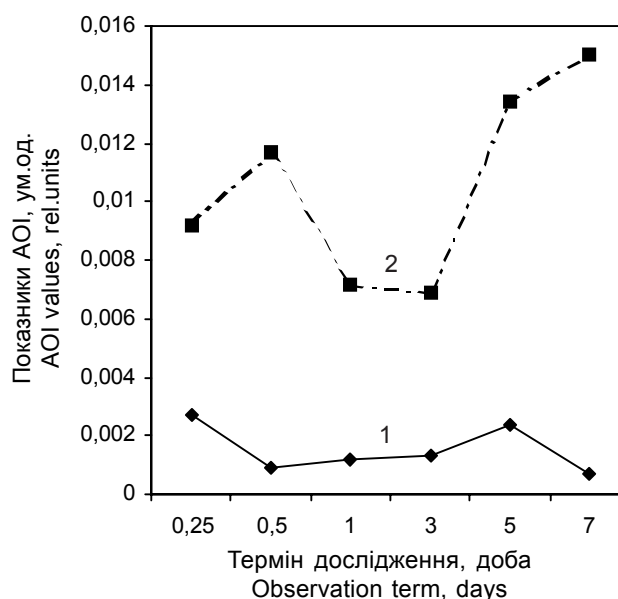


Рис.3. Показники АОІ: 1 – при ЕОХ; 2 – комбінованому застосуванні ЕХ.

Fig. 3. AOI values: 1 – at EB; 2 – at a combined ChE application.

level when using the combined way of the preparation application at first 6 hours showed no difference upon those obtained in the group of comparison, while in 12 hours this index was 3 times lower than in the group with no preparation ( $32.02 \pm 0.053$  versus  $90.65 \pm 0.09$ ). After 24 hrs of observation MDA level remained unchanged, by the 3<sup>rd</sup> day it did not differ on the group with no preparation, while by the 5<sup>th</sup> day it showed no difference upon the control values.

SOD activity at ChE combined treatment increased 1.5 times in 6 hours of the research still remaining at this level for 12 hours more, and the level of the 1<sup>st</sup> day indices showed no difference comparing to control group (Fig. 2). Starting from the 3<sup>rd</sup> day SOD indices gradually increased in dynamics and were higher than in group without the preparation: by 2.37 times in 3 days, 2.2 times higher in 5 days, 2.5 times higher by the 7<sup>th</sup> day. Combined use of the preparation increased by 2 times the catalase activity starting from the 6<sup>th</sup> hour of the investigation comparing to the indices in group without ChE injection. Indices remained at this level for all further observation terms. By the 7<sup>th</sup> day they were 2.4 times higher than in the group of comparison and 1.4 times higher comparing to the control group (Fig. 2).

Analysis on AOI testifies the combined use of the preparations enables us to increase the studied index by 3 times even in 6 hours of the experiment, and in 1 day it was 6 times higher, 5 times higher in 3 days, while in 5 days it was 5,6 times higher, and increased by 24 times in 7 days.

Therefore if by the 7<sup>th</sup> day AOI was 10 times decreased in the animals group with no preparation



4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.– 1988.– №1.– С. 16-19.
5. Кочетыгов Н. И. Ожоговая болезнь.– Л.: Медицина, 1973.– 244 с.
6. Оцінка Віталітету (загального рівня здоров'я). Інформаційно-методичний лист.– Трускавець, 2000.– С. 27.
7. Питько В.А. Нові підходи в лікуванні жінок з підгострими запальними захворюваннями придатків матки: Автореф. дис. ... докт. мед. наук.– Харків, 2001.– 36 с.
8. Суббота Н.П., Грищенко В.И., Питько В.А. и др. Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.– Харьков, 1997.– 5 с.
9. Суббота Н.П., Пашинский П.П., Кебкало А.Б. Криоконсервированные препараты, выделенные из печени плода человека, восстанавливают биохимические процессы при острой печеночной недостаточности // Укр. біохім. журн.– 1999.– №2.– С. 55-60.
10. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических мембранах и медицинских исследованиях.– М.: Медицина, 1975.– 295 с.

Надійшла 09.02.2005

injected comparing to the control group, at a combined use of the preparation it was 1.95 times higher (Fig. 3).

### Conclusions

Obtained data let us to conclude about high efficacy of ChE combined application: intramuscular injection in combination with bio-bandage. This method may be recommended for further working-out, more profound research and analysis in order to experimentally substantiate its clinical application.

### References

1. Bekhtereva N.P., Gilerovich E.G., Gurchik F.A. On embryonic neural tissue transplantation when treating Parkinson's disease // Journal of neuropathology and psychiatry named after Korsakov S.S.– 1990.– Vol. 90, N11.– P. 10-13.
2. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation in biological membranes.– Moscow: Nauka, 1972.– 252 p.
3. Kamyshnikov V.S. Reference book on clinical-biochemical laboratory diagnostics.– Vol. 2.– Minsk, 2000.– 463 p.
4. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G. Method for catalase activity evaluation // Laboratornoe delo.– 1998.– N1.– P. 16-19.
5. Kochetygov N.I. Burns.– Leningrad: Meditsina, 1973.– 244 p.
6. Vitality evaluation. Information-methodical letter.– Truskavets, 2000.– P. 27.
7. Pitko V.A. Novel approaches in treatment of women with sub-acute inflammatory *adnexa uteri* diseases: Author's thesis for Doctor's degree obtaining (medicine).– Kharkiv, 2001.– 36 p.
8. Subbota N.P., Grischenko V.I., Pit'ko V.A. et al. Obtaining, storage and application of chorion fragments, suspensions and cryoextract.– Methodical recommendations.– Kharkov, 1997.– 5 p.
9. Subbota N.P., Pashinsky P.P., Kebkalo A.B. Liver-derived cryopreserved preparations of different biological organization level recover biochemical processes at acute liver insufficiency// Ukr. Biochem. Journal.– 1999.– N2.– P. 55-60.
10. Urbakh V.Yu. Statistical analysis in biological membranes and medical research.– Moscow : Meditsina, 1975.– 295 p.

Accepted in 09.02.2005