



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ КОЖИ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

УДК 57.017.35

¹Аксенова В. И., ²Шарипова М. М., ³Извольская М. С., ³Воронова С. Н., ³Мельникова В. И.

¹Научно-производственная компания ООО «ОПТИСАЛТ»;

²ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет», г. Москва;

³Учреждение Российской академии наук «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», г. Москва

Аннотация.

Исследовано влияние растительных препаратов метосепта и витанорма на посттравматическую регенерацию тканей кожи крыс после нанесения им раны в межлопаточной области спины. Доказана эффективность локального использования препаратов, а также их применение внутрь в дозах 40–60 мг/крысу. Выявлено, что комплексное применение метосепта и витанорма стимулирует врожденный иммунитет, ускоряет восстановление дермы кожи и способствует раннему заживлению ран.

Введение.

В отличие от узконаправленного лиганд-рецепторного действия большинства известных химиопрепаратов, натуропатические лекарственные средства, как правило, характеризуются более широким спектром лечебно-профилактического действия вследствие их поликомпонентного состава и менее выраженными нежелательными побочными эффектами. Данное обстоятельство служит основанием для их приоритетного применения в восстановительной медицине. Развитие современных аналитических методов обеспечивает возможность строгого контроля содержания биологически активных веществ, входящих в состав натуропатических препаратов. Современные технологии позволяют заготавливать и перерабатывать лекарственное сырье, максимально сохраняя все его полезные свойства и обеспечивая производство препаратов согласно всем требованиям фармакопеи.

Повышенный исследовательский интерес к препаратам растительного происхождения способствует открытию у них ранее неизвестных свойств и механизмов лечебного действия. Растительный препарат «Метосепт» (регистрационное удостоверение 77.99.23.3.У.6252.6.05) изначально разрабатывался как противопаразитарное средство, а «Витанорм» (регистрационное удостоверение 77.99.23.3.У.6251.6.05К) – как средство, способствующее выведению из организма хозяина продуктов, образующихся при гибели паразитов. В дальнейшем были выявлены более широкие показания к комплексному применению этих двух препаратов [1]. Исходя из состава препаратов, можно предположить возможность их применения в качестве средств, ускоряющих заживление ран. Проверка этой рабочей гипотезы явилась целью представляемого исследования.

Материалы и методы.

Животные. Исследования выполнены на самцах крыс линии Вистар массой 180–200 г. Крысы содержали в стандартных условиях по 2 особи в клетке с контролируемыми режимами температуры (24°C) и освещения (в течение 12 ч), со свободным доступом к воде и пище.

Препараты. В исследованиях использовали смесь препаратов метосепт и витанорм. В состав метосепта

входят корень аира и одуванчика, гвоздика, полынь, тысячелистник, хвощ полевой. Наиболее активными веществами в препарате являются сапонины, фитохимикали иридоиды, горькие гликозиды (акорин), компоненты эфирных масел (азулены), алкалоидоподобное вещество ахиллен, а также микроэлементы: кремний, кобальт, ванадий, цинк, молибден. В состав витанорма входят корни лопуха, одуванчика и имбиря, содержащие эфирные и дубильные вещества, витамины А, Д, Е и группы В, камедь, и микроэлементы: марганец, медь, хром, железо, сера, цинк, селен, йод, кальций, фосфор, бор, магний. Отличительной особенностью комплекса обоих препаратов является наличие в них широкого спектра эссенциальных микроэлементов.

Суточную дозу препаратов (по 2 капсулы каждого) смешивали и рассчитывали терапевтическую дозу на 1 кг веса животного. Препараты смешивали с небольшим количеством пшеничного хлеба в виде шарика и ежедневно кормили животных в течение недели до и после нанесения раны до ее заживления (15–18 суток).

Схема эксперимента. Раневой процесс воспроизвели методом иссечения полнослойного кожного лоскута с повреждением подлежащей фасции и мышечного слоя в межлопаточной области (площадь раны 25 мм²) в проекции шейно-грудного отдела позвоночника. Все животные были разделены на 4 группы. Животные контрольной группы (1-я группа – 30 крыс) препарат не получали. Одна опытная группа крыс (2-я группа, 30 крыс) получала терапевтическую дозу препарата (4–6 мг/крысу в зависимости от веса животного). Другая опытная группа (3-я группа, 30 крыс) получала десятикратную дозу от терапевтической (40–60 мг/крысу), 4-й группе опытных животных (30 крыс) ежедневно наносили препарат в область раневой поверхности. На 2-е, 5-е, 8-е и 14-е сутки у животных контрольной и опытной групп брали биопсийный материал (кожу) для цитоморфологического и иммуногистохимического исследования процесса регенерации соединительнотканной основы кожи и состояния эпителизации поверхности раны, по 6 животных на каждую точку. Все манипуляции с животными осуществляли под нембуталовым наркозом (50 мг/кг веса). Воздействие препаратов на рану животных оценивали по площади и скорости заживления ран, гистологическому анализу, наличию дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и базофилов, а также по дифференцировке эпителиальных клеток кожи.

Площадь раневого поражения измеряли с помощью программы ImageJ. Результаты выражали в процентах от исходной площади. День нанесения ран считали нулевым днем эксперимента.

Фиксация, гистохимия, иммуногистохимия. Полнослойный фрагмент кожи иссекали в области раны и



Рис. 1. Динамика процесса заживления полнослойной кожной раны крысы при комплексном применении растительных препаратов метосепта и витанорма.

Группа 1 (контроль) – без воздействия препаратов; группа 2 – доза препаратов 4–6 мг/крысу; группа 3 – доза препаратов 40–60 мг/крысу; группа 4 – локальное нанесение препаратов на рану. День нанесения ран считали нулевым днем эксперимента.

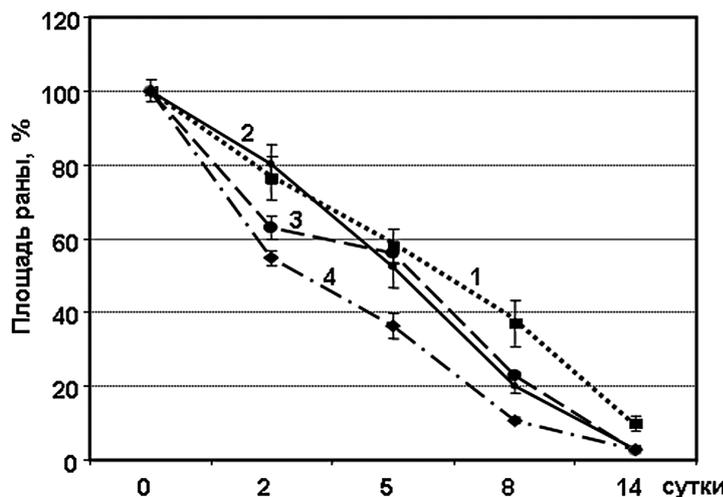


Рис. 2. Площадь кожной раны крыс в динамике процесса заживления под воздействием препаратов метосепта и витанорма. Результаты выражены в процентах от исходной площади.

1 – контрольная группа, без воздействия препаратов; 2 – группа крыс, принимавших препараты в дозах 4–6 мг/крысу; 3 – группа крыс, принимавших препараты в дозах 40–60 мг/крысу; 4 – локальное нанесение препаратов на рану. День нанесения ран считали нулевым днем эксперимента.

фиксируют в 4%-ном растворе параформальдегида в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в течение ночи при комнатной температуре. Далее фрагменты кожи инкубировали 24 ч в 15%-ном растворе сахарозы в PBS при 4°C и замораживали в изопентане при –40°C. Криостатные срезы кожи толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином с последующим анализом изображения с помощью светового микроскопа.

Для иммуногистохимического окрашивания использовали моноклональные антитела к смеси кератинов 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19 (Sigma, США), маркеров эпителиальных клеток, моноклональные антитела к поверхностному маркеру дендритных клеток крысы OX-62 (Cederlane, Канада) и моноклональные антитела к CD68 (Santa Cruz, США), выявляющие основные компоненты лизосомальных мембран макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и базофилов. Для иммуногистохимического окрашивания срезы последовательно инкубировали в PBS, содержащем 0,1% Тритона X-100 и 3% нормальной сыворотки теллят в течение 30 мин при 20°C, затем с моноклональными антителами мыши к смеси кератинов (разведение 1:100), OX-62 и CD68 (разведение 1:500) в течение 18 ч при 4°C, а затем со вторыми антителами к иммуноглобулину (IgG, 1:1000) мыши, меченными Alexa 488 (1:100), в PBS в течение 2 ч при 20°C. Специфичность антител подтверждали с помощью контролей, в которых реакцию проводили в отсутствие первых антител. Отсутствие флуоресцентной метки свидетельствовало о специфичности реакции. Реакцию анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMRXA2 (Германия), оснащенного соответствующим набором светофильтров и цифровой фотокамерой.

Результаты и обсуждение.

Влияние метосепта и витанорма на заживление раневой поверхности. Оценка площади раневой поверхности показала, что заживление полнослойной раны было более интенсивным в 4-й группе (препарат наносили на рану) и в 3-й группе животных (десятикратно увеличенная доза по сравнению с терапевтической), чем в контрольной (рис. 1, 2). Уже на 2-е постоперационные сутки происходило значительное уменьшение раневой поверхности и отечности у опытных животных в 4-й группе. Площадь раны составляла около 55%, а в 3-й – около 62%, тогда как в контроле и в терапевтической дозе – около 80% от исходной (рис. 2). На 5-е сутки площадь раневой поверхности в 4-ой группе составляла около 38%, а на 8-е – 10%. Во 2-й и 3-й группах, где животные принимали препарат внутрь, на 5-е сутки площадь раны составляла 60% и была сравнима с контролем. На 8-е сутки площадь ран во 2-й и 3-й опытных группах составляла 22%, а в контроле около 40%.

В заживление ран кожи включается процесс регенерации нарастающего на соединительнотканную основу эпителия [2]. Для оценки полноты эпителизации раны проводили сравнительный анализ гистоструктуры кожи животных разных групп (окраска гематоксилин эозином) и иммуногистохимическое окрашивание срезов кожи антителами ко всем кератинам, содержащимся в эпителиальных клетках кожи (кератины 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19). Кератины представляют собой класс белков промежуточных филаментов эпителия, которые создают механическую стабильность и целостность эпителиальных клеток и тканей [3]. Известно, что 15–20-е сутки соответствуют третьей фазе заживления ран – фазе формирования рубца и его эпителизации [4]. Согласно нашим данным,

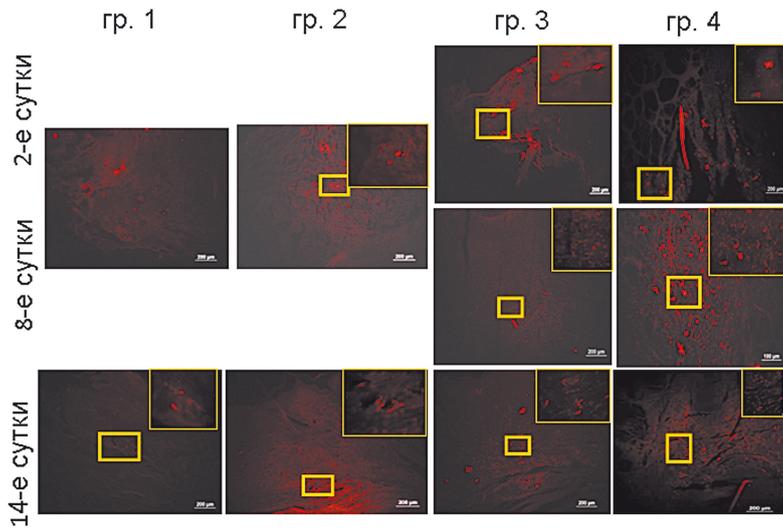


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание на OX-62 (маркер дендритных клеток) поперечных срезов кожи в области раны у животных, получавших препараты метосепт и витанорм, на 2, 8 и 14-е сутки после нанесения раны. 1 – контрольная группа, без воздействия препаратов; 2 – группа крыс, принимавших препараты в дозах 4-6 мг/крысу; 3 – группа крыс, принимавших препараты в дозах 40-60 мг/крысу; 4 – локальное нанесение препаратов на рану.

Иммунореактивные дендритные клетки окрашены красным цветом. В правом верхнем углу дендритные клетки при большом увеличении. Масштабный отрезок: 100 или 200 мкм.

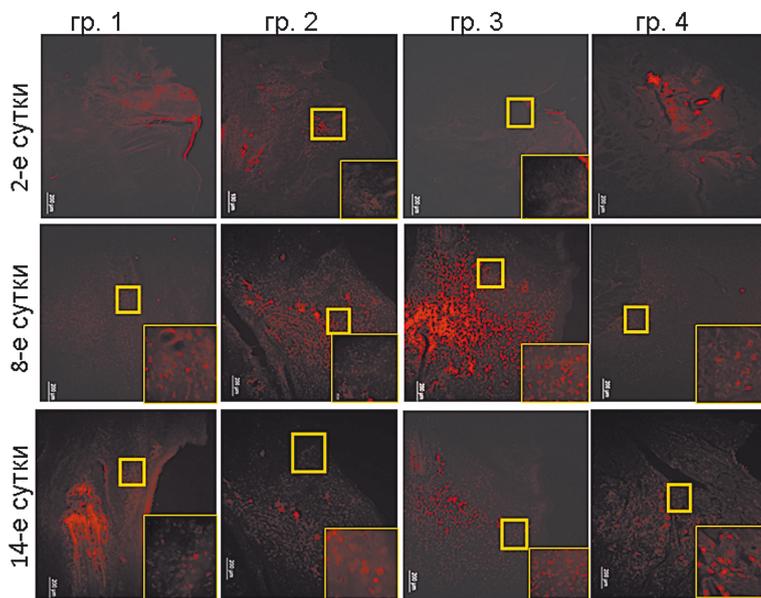


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание на CD68 (маркер макрофагов, моноцитов, базофилов) поперечных срезов кожи в области раны у животных, получавших препараты метосепт и витанорм, на 2, 8 и 14-е сутки после нанесения раны.

Иммунореактивные макрофаги окрашены красным цветом. В правом нижнем углу клетки при большом увеличении. Масштабный отрезок: 100 или 200 мкм.

анализ гистоструктуры кожи и уровень кератинов на 14-е сутки не выявил ярко выраженных различий у опытных животных по сравнению с контрольными. Однако следует отметить, что при локальном нанесении препаратов (4-я группа) на 14-е постоперационные сутки раны были практически очищены от струпа (рис. 1), а на 18-е сутки в 3-й и 4-й опытных группах были полностью покрыты волосным покровом. В контрольной группе полное заживление ран наблюдалось к 20–22-м суткам.

Таким образом, комплексное применение препаратов метосепта и витанорма ускоряет заживление ран. Регенерация ткани кожи под действием препаратов наиболее эффективно происходит при локальном их нанесении на рану, а также при их применении внутрь в дозах 40-60 мг/крысу.

Влияние метосепта и витанорма на иммунную систему кожи: на уровень дендритных клеток и макрофагов. Важную роль в процессах заживления ран играет местная иммунная система кожи. В коже локализуются дендритные клетки и макрофаги, количество которых значительно увеличивается при воспалении. Дендритные клетки локализуются в эпидермисе и дерме, где обеспечивают нейтрализацию и элиминацию проникающих в рану патогенов. Их относят к наиболее мощным антигенпредставляющим клеткам по сравнению с макрофагами [5, 6]. Дендритные клетки секретируют целый ряд веществ, необходимых для жизнедеятельности кожи, и в случае ее поражения и инфицирования продуцируют цитокины вос-

паления: интерлейкины-1 (ИЛ-1 β и ИЛ-6), фактор некроза опухолей (ФНО α), гамма-интерферон [7, 8, 9]. Под влиянием ИЛ-1 β и ФНО α эпидермальные дендритные клетки (в основе своей клетки Лангерганса) активно мигрируют в дерму, откуда выносятся тканевой жидкостью в афферентные лимфатические сосуды, а затем в регионарные лимфатические узлы [10, 11]. В дерме локализуются и собственно дермальные клетки, которые относятся, вероятно, к незрелым миелоидным дендритным клеткам [5].

При помощи иммуногистохимического окрашивания срезов кожи антителами к маркеру дендритных клеток крысы OX-62 выявлены дендритные клетки, как в опытной, так и контрольной группах животных. Однако у контрольных животных, не получавших препараты, они не были обнаружены на 2-е и 8-е сутки, небольшое их количество выявлялось только на 14-е сутки после нанесения раны (рис. 3). Наибольшее количество дендритных клеток определялось в 3-й и 4-й опытных группах животных, начиная с 8-х суток, что коррелировало с более быстрым заживлением ран в этих группах по сравнению с контролем. Следует отметить, что дендритные клетки в 3-й и 4-й опытных группах были выявлены уже на 2-е сутки после нанесения раны, хотя и в меньшем количестве, чем на 8-е и 14-е сутки (рис. 3).

Таким образом, различные субпопуляции дендритных клеток, экспрессирующих маркер OX-62 [12], участвуют в процессах регенерации ткани кожи.

При развитии раневых процессов в очагах воспаления выявляют также значительное количество макрофагов и в меньшем количестве – нейтрофилы и базофилы. Макрофаги, подобно дендритным клеткам, выполняют функции антигенпредставляющих и фагоцитирующих клеток, а после их активации патогенами продуцируют различные цитокины воспаления [13, 14].

При помощи иммуногистохимического окрашивания срезов кожи антителами к макрофагам, моноцитам, нейтрофилам и базофилам (CD68) в слоях кожи выявлены эти популяции клеток в опытной и контрольной группах. В контрольной группе животных макрофаги были обнаружены в достаточно большом количестве с 8-х суток, тогда как в опытных группах – уже со 2-х суток после нанесения

раны (рис. 4). Подобно дендритным клеткам, наибольшее количество макрофагов выявлено в 3-й и 4-й опытных группах на 8-е и 14-е сутки.

Таким образом, комплексное применение препаратов метосепта и витанорма вызывает увеличение количества дендритных клеток, макрофагов, нейтрофилов и базофилов в очаге воспаления.

Выводы.

Полученные данные позволяют заключить, что локальное комплексное использование растительных препаратов метосепта и витанорма, а также применение его внутрь в дозах 40-60 мг/на крысу стимулирует врожденный иммунитет, ускоряет восстановление дермы кожи и заживление ран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клиническое применение Метосепта и Витанорма. Учебное пособие, утвержденное ученым советом РМАПО. – М., 2005. – 46 с.
2. Ершова Т.В., Иванищук П.П., Диндяев С.В. Влияние обработки кожных ран у крыс гидролитическими ферментами на синтетическую активность эпидермоцитов // Цитология. – 1992. – Т. 34. – № 8. – С. 70–74.
3. Moll R., Divo M., Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell. Biol.* . 2008. – Vol. 129. – P. 705–733.
4. Бессонов А.Е., Чемерис Н.К., Галеев А.Б. и др. Репаративная регенерация тканей под действием электромагнитных волн миллиметрового, инфракрасного и части видимого диапазонов, генерируемых терапевтическим аппаратом “МИНИТАГ”. – <http://infomedcenter.ru/doc/наука/1.htm>
5. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. – 2001. – № 4. – С. 7–16.
6. Ni X, Duvic M. Dendritic cells and cutaneous T-cell lymphomas // *Ital. Dermatol. Venereol.* – 2011. – Vol. 146. – P. 103–113.
7. Зимица И.В., Лопухин Ю.М., Арион В.Я. Кожа как иммунный орган: клеточные элементы и цитокины // Иммунология. – 1994. – № 1. – С. 8–13.
8. Wollenberg A., Wagner M., Gunther S. et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases // *J. Invest. Dermatol.* – 2002. – Vol. 119. – P. 1096–1102.
9. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology // *Annu. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 23 – P. 1–21.
10. Wang B., Amerio P., Sauder D.N. Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66. – P. 33–39.
11. Смирнова И.О. Кветной И.М., Князькин И. В., Данилов С.И. Нейроиммуноэндокринология кожи и молекулярные маркеры ее старения. – СПб.: ДЕАН, 2005. – 288с.
12. Brenan M., Puklavac M. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 175. – P. 1457–1465.
13. McMorro J.P., Murphy E.P. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? // *Biochem. Soc. Trans.* – 2011. – Vol. 39. – P. 688–693.
14. Samy R.P., Thwin M.M., Chow V.T. et al. Evaluation of antibacterial activity of proteins and peptides using a specific animal model for wound healing // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 716. – P. 245–265.

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние растительных препаратов метосепта и витанорма на скорость посттравматической регенерации тканей кожи крысы. Изучена динамика дифференцировочной способности кожи после нанесения раны в межлопаточной области спины. Животные получали смесь препаратов ежедневно в течение недели до и в течение 18 суток после нанесения раны. Оценка площади раневой поверхности показала, что регенерация кожи наиболее эффективно происходит при локальном нанесении препаратов на рану. Применение препаратов внутрь было эффективно в дозе 40–60 мг/крысу. Уменьшение площади раневой поверхности и отечности наблюдалось уже на 2-е постоперационные сутки и составляла 10% на 8-е сутки, тогда как у крыс, не принимавших препараты, – 40% от исходной. На 14-е сутки раны были практически очищены от струпа, а на 18-е сутки – полностью покрыты волосным покровом. В контрольной группе полное заживление ран наблюдалось к 20–22-м суткам. Иммуногистохимически с помощью антител к маркерам дендритных клеток и макрофагов наибольшее их количество выявлено на 8-е и 14-е сутки в группах животных, принимавших препараты. Таким образом, комплексное применение препаратов метосепта и витанорма стимулирует врожденный иммунитет, ускоряет восстановление дермы кожи и заживление ран.

Ключевые слова: метосепт, витанорм, посттравматическая регенерация кожи, крысы, дендритные клетки, макрофаги.

SUMMARY

The influence of plant preparations metosept and vitanorm on posttraumatic regeneration rate of rat skin has been investigated. We performed the dynamics of the differentiation potential of rat skin on the 2nd, 8th and 14th days after a full thickness skin wound was made to the dorsum. The experimental animals were treated with a mixture of preparations every day for 1 week before and for 18 days after injury. The evaluation of the injured area exhibited that regeneration of skin most effectively occurs at local application of preparations. Oral treatment with preparations was effective in a dose of 40-60 mg/rat. The reduction of wound area and puffiness was observed at the 2nd day after the surgery and was 10% at the 8th postoperative day, whereas in the control rats it was 40% of initial Fourteen days after the loss of the scab was observed, and the recovery of hair growth was monitored at the 18th day. In the control group full healing of wounds was observed by 20-22 days. The highest number of dendritic cells and macrophages was revealed by immunohistochemistry in the experimental animals at the 8th and 14th days after injury. Thus, complex application of preparations metosept and vitanorm stimulates innate immunity, accelerates the recovery of the derma and facilitates wound healing.

Key words: metosept, vitanorm, posttraumatic regeneration of skin, rats, dendritic cells, macrophages.

Контакты

Мельникова Виктория Ильинична. Тел./факс (499)135-87-80; e-mail: v_melnikova@mail.ru.