

УДК 615.324: 615.015.32

ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ПИЯВКИ МЕДИЦИНСКОЙ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ КОЖИ У КРЫС

Попов Н.С.¹, Демидова М.А.¹, Шестакова В.Г.¹, Лебедева А.О.¹

ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия Минздрава России», Тверь, Россия (170100, г. Тверь, ул. Советская, 4), e-mail: m000293@tversu.ru

В экспериментах на крысах (n=16) проведена оценка противоожоговой активности водного извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной. У крыс опытной группы эпителизация ран отмечалась на 17-е сутки, что в 1,2 раза (p<0,05) быстрее, чем в у крыс контрольной группы. Начиная с 5-х суток (p<0,05) наблюдения скорость эпителизации ожоговых ран у животных, получавших экстракт пиявки, была в среднем в 3 раза выше (p<0,05), чем в контроле (8,8% при 2,9% в контроле). Результаты гистологических исследований подтвердили более быструю регенерацию поврежденных участков кожи у животных, получавших препарат из пиявки медицинской. На 10-е сутки у крыс опытной группы сформированная грануляционная ткань имела свойственное строение и была почти полностью покрыта эпителиальным слоем. У подопытных животных, получавших экстракт пиявки, на 15-е сутки соединительная ткань была более зрелая, строение регенерата приближалось к строению здоровой кожи.

Ключевые слова: пиявка медицинская лиофилизированная, водное извлечение, противоожоговое действие.

THE EFFECT OF HYDROUS EXTRACT OF MEDICAL LEECHES FREEZE-DRIED REPARATIVE PROCESSES ON CASE OF THERMAL SKIN INJURY OF RATS

Popov N.S.¹, Demidova M.A.¹, Shestakova V.G.¹, Lebedeva A.O.¹

Tver State Medical Academy, Tver, Russia (170100, Tver, Sovetskaja street, 4), e-mail: m000293@tversu.ru

During the experiment on rats (n=16) evaluated the contrambustion activity of the aqueous extract of medical leeches freeze-dried. Talking about the experimental group of rats saw that epithelization of wound was on the 17'th day. This is in 1,2 times (p<0,05) faster than that of the rats in the control group. Since the fifth day (p<0,05) of observation, the velocity of epithelization of burn wounds of animal, who got the extract of leech, on the average was three times higher (p<0,05) than in controls (8,8%, control group - 2,9%). The results of histological studies confirmed that animals, who got the specimen of the medical leeches, have more rapid regeneration of affected area faster. On the tenth days the granulation tissue of experimental rats was totally formed and had normal structure and was completely close covered by the epithelial layer. On the fifteenth day of observation we see that laboratory animals, who got the extract of leech, their connective tissue was more mature and the structure of regenerator was close to the structure of healthy skin.

Keywords: Medical leech freeze-dried, водное извлечение, aqueous extract, antiambustion activity.

Введение. Термические ожоги кожных покровов занимают особое место в структуре бытового и производственного травматизма. По этиологическому фактору наиболее распространенный вид поражения – это термические ожоги, они составляют 90,0-95,0% всех ожогов, на долю химических ожогов приходится от 2,5 до 5,1%, ожоги от электротравмы встречаются в 1,0-2,5% [3]. Следует отметить, что около 70% пострадавших от ожогов получают ограниченные по площади и не глубокие ожоги [3]. В структуре общего травматизма они занимают 3-е место среди травм мирного времени. Это связано с увеличением частоты получения ожогов в быту (около 70% среди всех ожогов) и на производстве, что можно

объяснить высокой энерговооруженностью производства, широкомасштабным применением токов высокого напряжения и агрессивных химических веществ [1].

В настоящее время отмечается прогрессивный рост числа больных с ожогами, при которых зона поражения не превышает 10% поверхности тела. Удельный вес этой категории пострадавших увеличился за последние 30 лет вдвое и достиг 60% от общего числа пострадавших от ожогов.

Одной из основных проблем лечения пострадавших от ожогов является своевременность и полнота восстановления кожных покровов, а также уменьшение выраженности воспаления. Известно, что водное извлечение из порошка пиявки медицинской лиофилизированной (НМ-1, ЗАО «Международный центр медицинской пиявки», Россия) обладает выраженным противовоспалительным действием [10; 11] и существенно сокращает сроки заживления ожоговых дефектов [9]. В секрете пиявки медицинской содержатся более 100 биологически активных веществ, которые сохраняют свое нативное состояние при сублимационной сушке, что позволяет создать новые противоожоговые лекарственные формы на основе лиофилизата.

Целью исследования явилась экспериментальная оценка противоожоговой активности водного извлечения из порошка пиявки медицинской лиофилизированной.

Материалы и методы. Оценку противоожоговой активности водного извлечения из порошка пиявки медицинской лиофилизированной (препарат НМ-1, ЗАО «Международный центр медицинской пиявки», Россия) проводили в экспериментах на 16 белых неинбредных крысах обоего пола массой 200 ± 20 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария Тверской государственной медицинской академии в соответствии с правилами качественной лабораторной практики [8; 12]. Перед постановкой эксперимента животные проходили карантин в течение 10-14 дней.

У всех подопытных животных моделировали термический ожог кожи. С этой целью за сутки до начала эксперимента кожу животных освобождали от шерсти с помощью ножниц и эпилинового крема, поверхность освобожденного от шерсти участка кожи составляла $2,5 \times 2,5$ см (около 5% от общей поверхности кожи животных). Термическую травму наносили с помощью стального трафарета (площадь поверхности 225 мм^2 , температура накаливания 200°C , время экспозиции 5 сек). В результате воздействия формировался ожог III Б степени площадью 4-5% от полной поверхности тела. Для обезболивания подопытных животных использовали эфирный наркоз, согласно требованиям Международного этического комитета по экспериментам на лабораторных животных [7]. Заживление ожогов происходило открытым способом. В течение всего эксперимента оценивали общее состояние подопытных животных, определяли массу тела.

Ежедневно проводили планиметрию по методике Б.Д. Морозова и А.Р. Стригановой [6] (с помощью прозрачной пленки и миллиметровой бумаги), оценивали внешний вид ран, наличие и характер отделяемого, вид струпа, отмечали сроки полного заживления ран.

Скорость эпителизации ожоговой раны (ΔS - относительное уменьшение площади раны) определяли по формуле Л.Н. Поповой (1).

$$\Delta S = \frac{(S_n - S_{n+1})}{S \cdot t} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где: S_n – величина площади раны при первом измерении (мм^2);

S_{n+1} – величина площади раны в день последующего измерения (мм^2);

t – число суток между измерениями.

Подопытным животным группы наблюдения ежедневно в течение 21-го дня после термической травмы наносили на ожоговую поверхность водное извлечение из пиявки медицинской лиофилизированной (0,05 мл). Животные группы контроля в те же сроки получали изотонический раствор натрия хлорида.

Противоожоговую активность исследуемого препарата пиявки медицинской оценивали по выживаемости подопытных животных, продолжительности полной эпителизации ожоговой поверхности по сравнению с контролем, а также по выраженности морфологических изменений в области раны на 5, 10 и 15-е сутки. Для этого производили биопсию краев ран с прилежащими к области дефекта участками неповрежденной кожи. Материал фиксировали в 10%-ном формалине с последующей проводкой по спиртам восходящей концентрации и ксилолам. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование полученных срезов выполняли на бинокулярном микроскопе «Микромед» при увеличении в 400 раз. С помощью окуляр-микрометра определяли размеры новообразованных структур регенерата: высоту струпа, грануляционной ткани, пограничной зоны эпителия, лейкоцитарного вала и протяженность эпителиального клина [13].

Результаты исследования обработаны статистически с применением стандартного пакета программ MicrosoftOfficeExcel 2003. Для ряда выборок вычисляли среднюю арифметическую и среднюю квадратическую ошибку. Определение нормальности распределения переменных проводили на основании гистограмм распределения, величины асимметрии и эксцессы. Для оценки достоверности различия выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический t-критерий Стьюдента. За достоверное принимали различие при уровне вероятности 95% и более ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ результатов экспериментального

исследования показал, что у всех подопытных крыс под влиянием термического воздействия развился однотипный термический ожог кожи III-Б степени, характеризовавшийся поражением всей толщи кожи с полной гибелью волосяных фолликулов, потовых и сальных желез. Кожа на месте ожога была плотная, неподвижная, не чувствительная на болевые раздражители. Вокруг раны отмечалась зона гиперемии шириной 6-8 мм. У подопытных животных группы контроля в течение 3-х суток после нанесения ожога наблюдали общие проявления ожоговой болезни (нарушение координации движения, вялость, отказ от еды), отмечали потерю в весе до 10% первоначальной массы тела.

На 2-е сутки наблюдения на месте ожоговой раны наблюдали образование рыхлого, неравномерного по толщине струпа. Кроме того, на раневой поверхности были обнаружены трещины, из которых выделялся экссудат с примесью крови. На 3-4-е сутки струп стал более плотным и возвышался по отношению к здоровым участкам кожи. Края струпа были неровными. Полное заживление травмированного участка кожных покровов у животных группы контроля происходило в течение $20,8 \pm 0,2$ суток.

При нажном применении водного извлечения пиявки медицинской лиофилизированной при термическом ожоге у крыс заживление ожоговых ран происходило в среднем в 1,2 раза ($p < 0,05$) быстрее, чем в контроле (полное восстановление кожного дефекта отмечено на $16,5 \pm 0,2$ сутки после термической травмы). Причем с 5-х суток ($p < 0,05$) наблюдения скорость эпителизации ожоговых ран у животных, получавших экстракт пиявки, была в среднем в 3 раза выше ($p < 0,05$), чем в контроле (8,8% при 2,9% в контроле) (рис. 1).

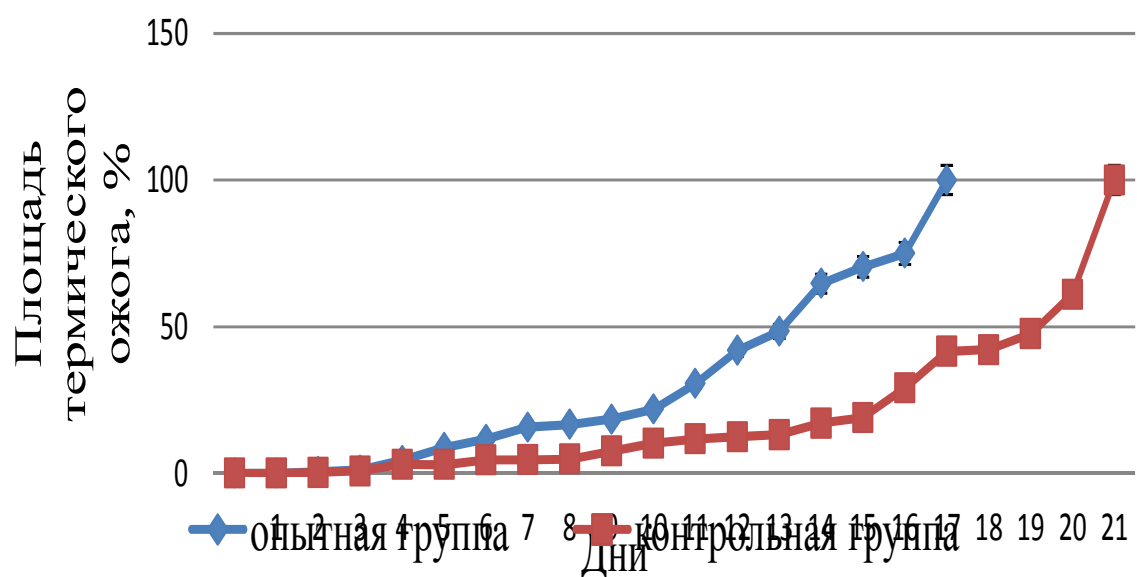


Рисунок 1 - Скорость эпителизации ожоговой раны у подопытных крыс при наружном применении водного извлечения пиявки медицинской лиофилизированной.

Результаты гистологических исследований подтвердили более быструю регенерацию поврежденных участков кожи у животных, получавших препарат из пиявки медицинской. Было показано, что на 5-е сутки наблюдения у животных группы контроля и опытной группы в зоне повреждения отмечались дистрофические и некротические изменения эпидермиса и дермы. В дерме было отмечено наличие выраженного отека с воспалительной клеточной инфильтрацией из лейкоцитов. В большинстве кровеносных сосудов наблюдали стаз форменных элементов крови. Вместе с тем у подопытных крыс, получавших экстракт пиявки, в зоне повреждения были отмечены новообразованные кровеносные сосуды.

На 10-е сутки эксперимента у животных контрольной группы ожоговая поверхность была покрыта фрагментированным струпом толщиной $150,85 \pm 12,34$ мкм, под которым наблюдали небольшой лейкоцитарный вал ($88,48 \pm 10,68$ мкм). Толщина грануляционной ткани составила $814,80 \pm 20,20$ мкм, ее верхний слой был пронизан сосудами. Одновременно были выявлены признаки перехода грануляционной ткани в соединительную – наблюдали появление бугорков из сочных круглых и овальных клеток, располагающихся вокруг новообразованных капилляров, с последующей потерей ядра и переходом в удлиненную форму. Длина эпителиального клина составила $711,09 \pm 12,3$ мкм. Базальная мембрана имела ровную поверхность с выростами в подлежащую ткань в краевых участках. Эпителий на границе повреждения был гипертрофирован ($p < 0,05$) и составил $155,82 \pm 12,43$ мкм толщиной (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1

Морфологические изменения при термическом ожоге кожи у крыс
на 10-е сутки после термической травмы

Серия опыта	Толщина, мкм				Длина регенерата, мкм
	Струп	Лейко- цитарный вал	Грану- ляционная ткань	Пограничная зона эпителия	
Контроль (термический ожог + изотонический раствор NaCl)	$150,85 \pm 12,34$	$88,48 \pm 10,68$	$814,80 \pm 20,20$	$155,82 \pm 12,43$	$711,09 \pm 12,3$

Термический ожог + водное извлечение из порошка пиявки медицинской	176,8±12,52*	56,4±7,45*	773,3±23,39	149,91±17,05	953,13±21,58*
--	--------------	------------	-------------	--------------	---------------

*Примечание: * - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$)*

У подопытных животных, получавших экстракт пиявки, протяженность регенерата (эпителиального клина) была в среднем в 1,3 раза ($p < 0,05$) больше, чем в контроле. Вновь образованный эпителий нарастал на грануляционную ткань с двух сторон навстречу друг другу. У 50% животных наблюдали полную эпителизацию дефекта кожи. Сформированная грануляционная ткань имела собственное строение и была почти полностью покрыта эпителиальным слоем. Под эпителием располагалась молодая соединительная ткань, основное место в которой принадлежало слою горизонтально ориентированных фибробластов. Толщина струпа у крыс опытной группы была в среднем в 1,2 раза ($p < 0,05$) больше, а толщина лейкоцитарного вала в 1,7 раза ($p < 0,05$) меньше, чем в контроле (рис. 2).

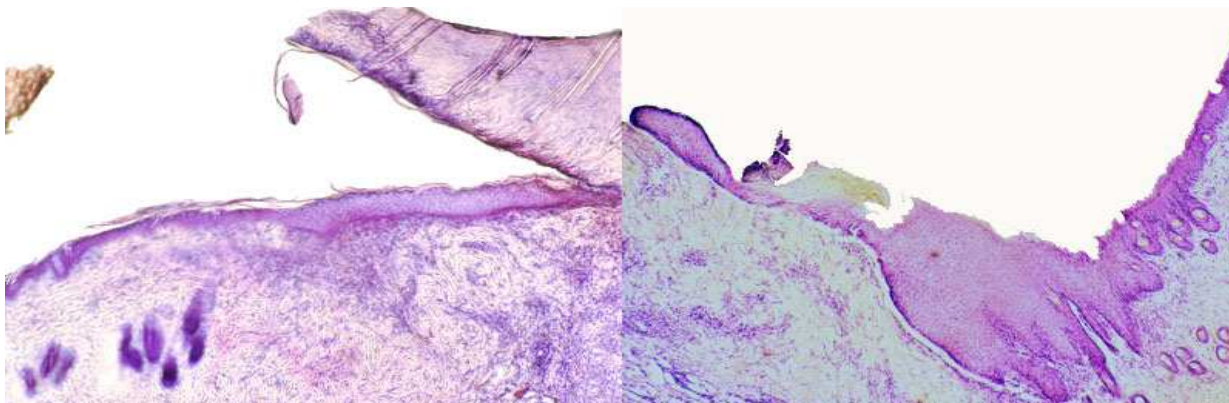


Рисунок 2 – Гистологическая картина ожогового дефекта у крыс группы контроля (слева) и опытной группы (справа), 10-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х.

На 15-е сутки эксперимента у крыс опытной и контрольной группы было отмечено полное покрытие дефекта эпителиальной тканью. Соединительная ткань под эпителием имела

типичное строение. У подопытных животных, получавших экстракт пиявки, соединительная ткань была более зрелая, строение регенерата приближалось к строению здоровой кожи. Базальная мембрана в зоне повреждения имела выросты, из которых формировались волосные фолликулы, а также сальные и потовые железы (рис. 3, 4).

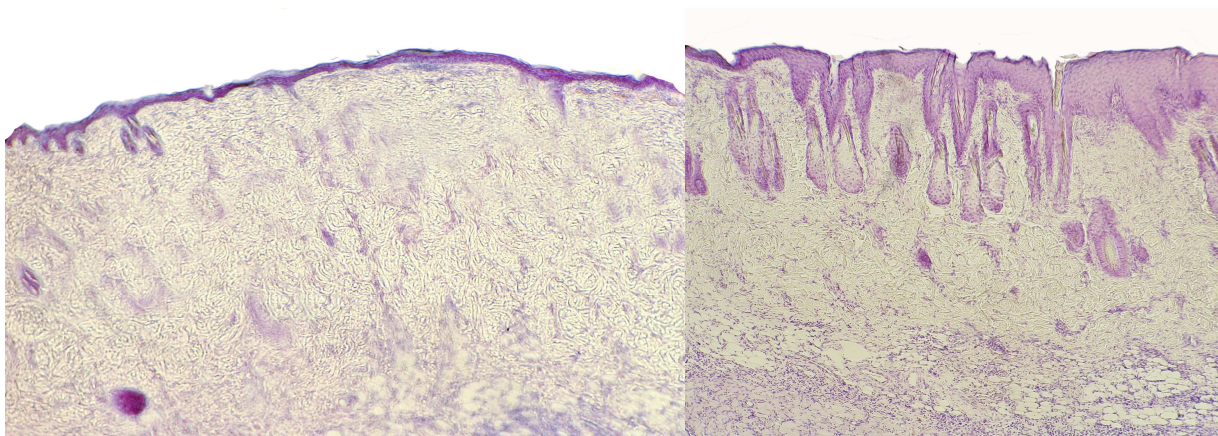


Рисунок 3 – Гистологическая картина ожогового дефекта у крыс группы контроля (слева) и опытной группы (справа), 15-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х.

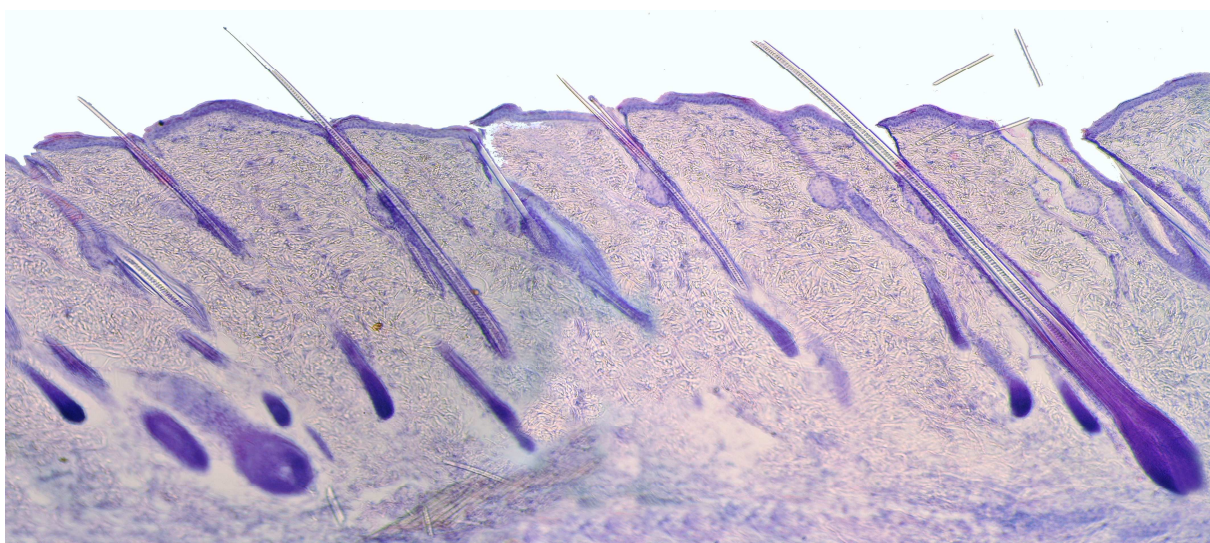


Рисунок 4 - Гистологическая картина здоровой кожи. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400х.

Результаты эксперимента показали, что водное извлечение из пиявки медицинской лиофилизированной существенно ускоряет эпителизацию ран при термическом ожоге III-Б степени у крыс. Вероятно, выявленная противоожоговая активность водного извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной связана с содержанием большого числа биологически активных веществ, основными из которых являются гирудин, дестабилазный комплекс, ингибиторы трипсина и химотрипсина, простагландины и гиалуронидаза и другие. Наличие в

составе водного извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной гиалуронидазы – фермента, катализирующего реакции гидролитического расщепления и деполимеризации гиалуроновой кислоты, облегчает проникновение в ткани других составных частей препарата и повышает его активность. Репаративный эффект водного извлечения из препарата пиявки медицинской лиофилизированной можно, по-видимому, расценивать, как интегральный результат иммуностимулирующего, антисептического и противовоспалительного действия веществ, входящих в состав пиявки медицинской [4]. Установлено, что в гнойно-некротической фазе и фазе грануляции раневого процесса значительно нарушается гемомикроциркуляция, которая приводит к нарушению обменных процессов. Входящие в состав препарата вещества с антикоагулянтной активностью, по-видимому, способствуют снижению вязкости крови и улучшению трофики образующихся тканей. Сбалансированный набор БАВ, вероятно, комплексно оказывает стимулирующее действие на репаративные процессы. Гиалуронидаза обеспечивает проникновение прочих биологически активных веществ в ткани путем разрушения гиалуроновой кислоты — важнейшего компонента межклеточного матрикса. Саратин и калин ингибируют адгезию тромбоцитов к поврежденной поверхности сосудистой стенки и их агрегацию. Ингибитор фактора Ха и гирудин блокируют плазменное звено гемостаза, дестабилаза-лизозим обеспечивает антибактериальный статус пиявочного секрета. γ -Глутамилтранспептидаза совместно с дестабилазой-мономеразой пиявочного секрета участвует в регуляции жидкого состояния крови путем высокоспецифического гидролиза эндо- ϵ -(γ -Glu)-Lys изопептидных связей в стабилизированном фибрине и D-димере [2].

Противомикробное действие препаратов пиявки также складывается из гиалуронидазной активности, благодаря которой повреждается мембрана некоторых бактериальных тел, содержащих гиалуроновую кислоту.

Предположительная роль пиявочного секрета в ликвидации воспалительных явлений заключается, вероятно, в восстановлении проницаемости гистогематических барьеров и микроциркуляторного русла для эффекторов иммунитета, а также в индукции более тонких иммунологических реакций. Известно значение интерлейкинов в воспалении. Преимущественное значение принадлежит интерлейкину-1, который активирует липидные медиаторы: простагландины и фактор активации тромбоцитов. Иммуностимулирующее действие обеспечивается воздействием на уровне системы комплемента. Отмечается также и повышение фагоцитарной активности крови за счет биологически активных веществ, содержащихся в пиявке медицинской [4].

Для репаративной активности препаратов пиявки медицинской имеет значение ее воздействие на белковый и липидный обмен. Благоприятное влияние на обмен жиров заключается в активации метаболизма холестерина и триглицеридов, увеличении суммарных липидов кожи. Комплекс БАВ пиявки медицинской способствует увеличению синтеза ДНК и белка в клетках кожи человека, стимулируя тем самым пролиферативные процессы. При длительном воздействии активных веществ пиявки более эластичной и проницаемой становится стенка сосуда, что обеспечивает полноценную доставку питательных веществ и удаление продуктов распада [5].

Выводы

1. При термическом ожоге кожи III-Б степени у крыс полное заживление пораженного участка кожи отмечалось в течение $20,8 \pm 0,2$ дня.
2. При наружном применении водного извлечения из порошка пиявки медицинской лиофилизированной сроки эпителизации ожоговой раны у подопытных крыс сокращались в среднем в 1,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.
3. На 15-е сутки после нанесения термической травмы гистологическая структура регенерата у подопытных животных, получавших водное извлечение из порошка пиявки медицинской, приближалась к строению здоровой кожи.

Список литературы

1. Анощенко Ю.Д. Медико-социальная характеристика больных с ожоговой травмой. — 1993. — № 8. — С. 16–17.
2. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Басанова А.В., Сасс А.В. Биохимия. – 2001. - 66. - 1690-7.
3. Вихриев Б.С. Ожоги : руководство для врачей / Б.С. Вихриев, В.М. Бурмистров. - 2-е изд., перераб. и доп. - Л., 1986. - 272 с.
4. Галимова И.А. Научные основы гирудотерапии // Альтернативная медицина. - 2004. - № 2. - С. 28-31.
5. Государственный реестр лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению. – М., 2008. – 1005 с.
6. Иваненко Т.В. Влияние кальцитонина на репаративную регенерацию кожи в условиях хронической гипоксии : дис. ... к. м. н. - Калинин, 1976.
7. Каркищенко Н.Н. Лабораторные животные (положение и руководство). - М. : Межакадемическое издательство «ВПК», 2003. - 138 с.

8. Об утверждении Правил лабораторной практики : Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708 н: зарегистр. в Минюсте Рос. Фед. 13 октября 2010 г. N 18713 // Рос. газ. – 2010. – 22 октября.
9. Попов Н.С. Исследование противоожоговой активности водного извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной // Врач-аспирант. - 2013. - № 5.2 (60). – С. 314-320.
10. Попов Н.С., Демидова М.А., Лебедева А.О. Исследование противовоспалительной активности водного извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной // Традиционная медицина. - 2011. - № 5. – С. 335 – 338.
11. Попов Н.С., Демидова М.А., Шнеур С.Я., Лебедева А.О. Сравнительная характеристика противовоспалительной активности мази и геля с экстрактом пиявки медицинской лиофилизированной // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. - URL: www.science-education.ru/102-5813 (дата обращения: 09.01.2014).
12. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М. : ВНЦ БАН, 2000. – 352 с.
13. Шестакова В.Г. Динамика содержания фосфоинозитидов в крови и грануляционной ткани при заживлении полнослойных ран кожи в условиях электропунктуры : дис. ... канд. биол. наук. – Тверь, 1996. – С. 176.

Рецензенты:

Платонов И.А., д.м.н., профессор кафедры фармакологии с курсом фармации ФПК и ППС Смоленской государственной медицинской академии, г. Смоленск.

Слюсарь Н.Н., д.м.н., профессор, ИП «Лаборатория профессора Слюсаря Н.Н.», г. Тверь.