

УДК 616.5-003.93

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ РЕГЕНЕРАТА КОЖИ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОВ

Петрова М.Б., Харитоновна Е.А., Павлова Н.В., Костиук Н.В.

ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия Минздрава России»,
Тверь, e-mail: pmargo2612@mail.ru

Проведена оценка эффективности влияния комплекса природных цитокинов «Суперлимф» на раневой процесс в коже белых крыс. Препарат применялся местно сразу после нанесения полнослойного раневого дефекта и 5 последующих дней. Установлено, что аппликации препарата активизируют хемотаксис нейтрофилов уже с первых часов репаративного процесса. Функционально активные лейкоциты индуцируют проникновение в очаг повреждения клеток макрофагального ряда, что приводит к локализации воспаления. Ультраструктурно макрофаги отличались признаками функционального возбуждения и активации их фагоцитарного аппарата. В цитоплазме наблюдались скопления большого числа вторичных лизосом и остаточных телец. Оптимизация течения воспалительной реакции создавала благоприятные условия для последовательного осуществления этапов посттравматической регенерации, стимулировала регенеративный потенциал организма, что проявлялось в сокращении срока заживления ран кожи.

Ключевые слова: раневой процесс, воспаление, нейтрофильные лейкоциты, макрофаги, цитокины

MORPHOLOGICAL REACTIONS OF THE SKIN REGENERATE IN THE CONDITIONS OF USING OF CYTOKINES

Petrova M.B., Kharitonova E.A., Pavlova N.V., Kostiuk N.V.

Tver state medical Academy, Tver, e-mail: pmargo-2612@mail.ru

The effectiveness of the influence of a complex of natural cytokines «Superlymph» on the wound process in the skin of the white rats was evaluated. The medication was used locally right after making of full-layer defect of skin and during 5 following days. It is established that the applications of the «Superlymph» stimulate the chemotaxis of neutrophils from the first hours of the reparative process. Functionally active leukocytes induce penetration of the cells of macrophage series into the center of damage that leads to the localization of the inflammation. The ultrastructural investigation of macrophages showed the signs of their functional excitation and the activation of phagocytes apparatus. There were accumulation of a large number of secondary lysosomes and residual bodies in the cytoplasm. Optimization of the inflammatory reaction led to formation of favorable conditions for the consecutive implementation of the stages of post-traumatic regeneration and stimulated the regenerative potential of the organism, which manifested in the reduction of time of healing of skin wounds.

Keywords: wound process, inflammation, neutrophils, macrophages, cytokines

Уровень естественной резистентности организма во многом определяет течение физиологических и патологических реакций, в том числе и при заживлении ран кожи. Достаточно часто возникают ситуации, требующие стимуляции репаративных процессов с учетом разных аспектов действия терапевтического средства [3, 7]. При повреждениях различного генеза в тканях развивается стереотипный воспалительно-репаративный процесс, имеющий общие закономерности и характеризующийся рядом последовательно сменяющихся стадий. В настоящее время весьма актуальным является оценка регулирующего действия иммунной системы посредством цитокинов на процессы жизнедеятельности биологических систем. Цитокины координируют все этапы развития воспаления и адекватность ответа на внедрение патогена, обеспечивая его отграничение и удаление, а затем и полноценную репарацию поврежденной структуры тканей [2, 11]. При этом необходимо, чтобы воспаление как защитная реакция организма протекало в темпе и объеме, соответствующем степени повреждения.

Цитокины представляют собой сложный комплекс эндогенных иммунорегуляторных молекул [8]. Отдельные и комбинированные вещества цитокинового ряда являются основой для создания естественных и рекомбинантных иммуномодулирующих фармакологических средств. «Суперлимф», избранный для наших исследований, является комплексом естественных цитокинов, продуцируемых *in vitro* при индукции мононуклеаров периферической крови свиней Т-митогеном – фитогемагглютинином. «Суперлимф» представляет собой стандартизованный естественный комплекс природных иммунопептидов молекулярной массой менее 40 000 Da, содержащий такие цитокины, как интерлейкины IL-1, IL-2, IL-6, факторы, ингибирующие миграцию фагоцитов, некроза опухоли, трансформирующий фактор роста [5]. Препарат выпускается в стерильном лиофилизированном виде в ампулах, содержащих 0,1 мг активного вещества и 5 мг стабилизатора полиглюкина. «Суперлимф» производства ООО «Центр иммунотерапии «Имунохелп» (Россия, регистрационное удостоверение № РМ002447/01-2003

выдано Министерством здравоохранения РФ от 12.05.2003 г.) предназначен для местного и наружного применения.

Цель наших исследований состояла в комплексном морфологическом изучении специфики влияния аппликаций препарата «Суперлимф» на заживление ран по сравнению со спонтанным течением репаративного процесса в коже.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 60 белых крысах-самцах линии «Вистар» средней массой 150 г, которые содержались и выводились из эксперимента в соответствии с международными рекомендациями и соблюдением принципов гуманного отношения к лабораторным животным. Под эфирным наркозом им наносились полнослойные дефекты кожи площадью 225 мм² на спинной поверхности тела. Крысы были разделены на две группы. Группу 1 (опытную) составили животные, на раневые дефекты которых ежедневно наносили препарат «Суперлимф» (сухое вещество ампулы разводилось в 2 мл физиологического раствора) по 1 капле один раз в сутки в течение пяти дней, первая аппликация препарата проводилась сразу после нанесения повреждения. На раны крыс группы 2 (контрольной) наносили физиологический раствор по той же схеме. Для оценки воспалительной фазы регенерации исследовались отпечатки, полученные с поверхности раневого дефекта через 6, 12 и 24 часа наблюдения после нанесения травмы. Отпечатки подсушивались на воздухе, фиксировались метиленовым синим по Май-Грюнвальду и окраши-

вались азур-эозином согласно методике Романовского. Количество нейтрофилов и макрофагов в цитограммах подсчитывалось в световом микроскопе в 10 полях зрения при 1000-кратном увеличении.

Для изучения морфологических изменений тканей регенерата на ультраструктурном уровне на третьи сутки после операции брались биоптаты, которые фиксировались в глутаровом альдегиде, заливались в аралдит и изучались под электронным микроскопом LVEM5. Скорость сокращения ареала раневой поверхности оценивали планиметрическим методом. Во всех случаях анализа количественных данных для определения значимости различий средних величин использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование цитологического состава раневого экссудата показало, что первыми клетками, заселяющими рану, являлись нейтрофилы, и на протяжении всего срока изучения они преобладали количественно. В препаратах, полученных через 6 часов после нанесения травмы, нейтрофильные гранулоциты исчислялись десятками, тогда как макрофаги выявлялись единично в поле зрения. Наряду с этим обращало на себя внимание отличие в качественных и количественных характеристиках клеточных элементов раневого экссудата у животных разных экспериментальных групп (табл. 1).

Таблица 1

Динамика изменения (M ± m) клеточного состава раневого экссудата

Группы животных	Нейтрофилы		Макрофаги	
	количество	диаметр	количество	диаметр
Через 6 часов после операции				
1	117,9* ± 20,3	9,8 ± 0,8	4,5* ± 0,6	9,4* ± 1,5
2	48,8 ± 11,3	6,7 ± 0,7	0	0
Через 12 часов после операции				
1	382,7* ± 31,2	10,9* ± 0,9	12,1* ± 1,2	13,2* ± 1,5
2	127,0 ± 22,3	7,7 ± 0,5	3,6 ± 0,3	9,2 ± 0,8
Через 24 часа после операции				
1	108,1 ± 18,3	11,2 ± 6,9	21,2 ± 5,6	11,2 ± 3,1
2	110,5 ± 19,2	8,1 ± 4,9	14,9 ± 2,3	11,8 ± 2,9

Примечание: * различия достоверны по сравнению с группой 2 при p ≤ 0,05.

У животных группы 1 аппликации препарата «Суперлимф» непосредственно после операции вызывали более активную миграцию нейтрофилов и макрофагов в рану. Через 6 часов наблюдения в раневом экссудате нейтрофилов в 2,4 раза больше, чем у животных контрольной группы. Кроме нейтрофилов в цитограммах обнаруживались единичные макрофаги – ключевые клетки репаративного процесса. В отпечатках крыс группы 1 насчитывалось 4,5 ± 0,6

этих клеток, в то время как в группе плацебо они еще не обнаруживались. Микроорганизмы заселяли раневое поле и находились вне- и внутриклеточно у животных обеих экспериментальных групп.

Через 12 часов после нанесения дефекта в отделяемом ран количество нейтрофильных гранулоцитов у животных группы 1 увеличилось в 3,2 раза до 382,7 ± 31,2 клеток, тогда как у крыс группы 2 увеличение произошло в 2,6 раза и составило лишь

127,1 ± 22,3 клеток (различия достоверны). Количество макрофагов возросло до 12,1 ± 1,2 против 3,6 ± 0,3 в контроле. К этому времени в цитограммах крыс группы 1 микроорганизмы встречались только в единичных полях зрения и преимущественно внутриклеточно. В отделяемом ран контрольной группы животных микробная флора обнаруживалась преимущественно внеклеточно в среднем в 7 полях зрения из 10.

К концу первых суток наблюдения (через 24 часа после нанесения раны) активность воспалительного процесса у крыс группы 1 резко снизилась, на что указывало значительное уменьшение числа нейтрофильных гранулоцитов до 108,1 ± 18,3 и появление клеток с признаками апоптоза, в то время как у животных без лечения количество лейкоцитов уменьшилось незначительно. Интенсивность миграции макрофагов продолжала увеличиваться у животных обеих групп, но при применении «Суперлимфа» их насчитывалось в 1,4 раза больше, чем в контрольной. Дальнейшее цитологическое исследование не представлялось возможным из-за образования струпа, своеобразной «биологической повязки», защищающей подлежащие ткани от вредного воздействия окружающей среды и предотвращающей потерю тканевой жидкости.

Исследование под электронным микроскопом биоплатов регенерирующей ткани крыс группы 1 на третьи сутки после травмы показало, что значительное количество нейтрофилов находилось в состоянии некроза, о чем свидетельствовали поврежденная цитоплазматическая мембрана и стертый рисунок ядерного хроматина клеток. Ультраструктурные изменения макрофагов характеризовались признаками функционального возбуждения, такими как набухание, увеличение объема их ядер. Ядерный хроматин был равномерно распределен по всей площади ядра, ядрышки располагались эксцентрично. Каналы гранулярного эндоплазматического ретикулама значительно расширены, отмечались признаки активации фагоцитарного аппарата. В цитоплазме макрофагов наблюдались скопления большого числа вторичных лизосом, обнаруживалось много остаточных телец.

По результатам планиметрии у животных группы 1 при применении «Суперлимфа» после нанесения раневого дефекта рубец образовался к 13 дню, тогда как у контрольной группы крыс к 15 дню еще сохранялся струп средней площадью 4 мм².

Анализ полученных результатов показал, что противовоспалительные цитокины препарата «Суперлимф» активизируют хемотаксис нейтрофилов, вызывают

их более выраженную функциональную активность уже с первых часов репаративного процесса. Вероятно, «Суперлимф» усиливает адгезию нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов к эндотелию путем увеличения экспрессии адгезионных молекул ICAM-1 и VCAM-1 с последующим выходом этих клеток из сосудистого русла в очаг повреждения [6, 13]. Это ведет к бурной воспалительной реакции и быстрому очищению раневого поля от инфекционных агентов. Однако противовоспалительный компонент лекарственного средства не дает процессу принять гиперэргический характер с аутолизом неповрежденных тканей. «Суперлимф» усиливает фагоцитарную активность макрофагов и способствует антибактериальной защите организма [1, 4, 14]. В работах [9, 10, 12] обосновывается мнение о том, что такие цитокины, как TNF- α , IL-1 и IL-6 вызывают ряд морфологических и молекулярных изменений, приводящих к индукции притока мононуклеарных фагоцитов в очаг поражения и, как следствие, к локализации воспаления.

Заключение

Влияние аппликаций «Суперлимфа» на течение первой фазы репаративного процесса, исследованного на ультрамикроскопическом и клеточном уровнях, проявляется в оптимизации воспалительной реакции, делая ее более интенсивной с первых часов, но ограничивая продолжительность этой стадии. «Суперлимф» создает благоприятные условия для последовательного осуществления этапов посттравматической регенерации, стимулирует регенеративный потенциал и позволяет локализовать патоморфологические изменения, что приводит к сокращению срока заживления ран кожи данной площади и локализации на 3 дня.

Список литературы

1. Долгушин И.И. Антимикробные эффекты секреторных продуктов нейтрофилов // Известия Челябинского научного центра. – 2001. – № 11. – С. 104–106.
2. Егорова В.Н., Смирнов М.Н. Новые возможности иммунотерапии с использованием Ронколейкина – рекомбинантного интерлейкина-2 человека // Tetra Medica. – 1999. – № 2. – С. 15.
3. Ефименко Н.А., Шин Ф.Е., Толстых М.П. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран // Военно-медицинский журнал. – 2002. – № 1. – С. 48–52.
4. Злакоманова О.Н. Состояние системы цитокинов у детей с травматической болезнью // Травматология и ортопедия России. – 2008. – Т. 48. – № 2. – С. 65–71.
5. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. Природная композиция цитокинов (Суперлимф) в топической иммунокоррекции // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. – № 7. – С. 25–27.

6. Марченко В.И. Использование цитокинов в лечении травм [Электронный ресурс], 2007 – URL: <http://www.mediasphera.ru/journals/pirogov/detail/336/4948/> (дата обращения: 12.09.2010).

8. Петрова М.Б. Оценка эффективности электропунктуры при заживлении полнослойного дефекта кожи с помощью электронной микроскопии / М.Б. Петрова, В.Г. Шестакова, Е.А. Харитоновна, Н.В. Павлова, Л.А. Курбатова // Теоретические и практические инновации в науке: материалы Междунар. конф. (Гданьск, 28–30 апреля 2012 г.) – Гданьск, 2012. – С. 14–18.

9. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. Основы медицинской иммунологии: учебник – М.: Мир, 2006. – 320 с.

10. Топчий И.И. Нейтрофилы и моноциты при повреждении сосудистого эндотелия как звенья единой патогенетической цепи в развитии хронической болезни почек и атеросклероза [Электронный ресурс], 2009. – URL: <http://internal.mif-ua.com/archive/issue-6792/article-6834/> (дата обращения: 11.10.2012).

11. Arora S. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* / S. Arora, M.A. Olszewski, T.M. Tsang, R.A. McDonald, G.B. Toews, G.B. Huffnagle // *Infection and immunity*. – 2011. – Vol. 79, № 5. – P. 1915–1926.

12. Ioannidou E. Therapeutic modulation of growth factors and cytokines in regenerative medicine // *Current pharmaceutical design*. – 2006. – Vol. 12, № 19. – P. 397–408.

13. Lowes K.N. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors / K.N. Lowes, E.J. Croager, J.K. Olynyk, L.J. Abraham, G.C. Yeoh // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 2003. – Vol. 18, № 1. – P. 4–12.

14. Mehibel M. Effects of cytokine-induced macrophages on the response of tumor cells to banoxantrone (AQ4N) / M. Mehibel, S. Singh, E.C. Chinje, R.L. Cowen, I.J. Stratford // *Molecular Cancer Therapeutics* May. – 2009. – Vol. 8, № 5 – P. 1261–1269.

15. Scull C.M., Hays W.D., Fischer T.H. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets // *Journal of Inflammation*. – 2010. – 7:53. – URL: <http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/53> (accessed: 16.01.13).

16. Vidal P.M. The role of «anti-inflammatory» cytokines in axon regeneration / P.M. Vidal, E. Lemmens, D. Dooley, S. Hendrix // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2013. – Vol. 24, № 1. – P. 1–12.

5. Koval'chuk L.V., Gankovskaya L.V. Prirodnyaya kompozitsiya tsitokinov (Superlimf) v topicheskoy immunokorrekcii // *Allergiya, astma i klinicheskaya immunologiya*. 2000. no. 7. pp. 25–27.

6. Marchenko V.I. Ispol'zovanie tsitokinov v lechenii travm, 2007 – URL: <http://www.mediasphera.ru/journals/pirogov/detail/336/4948/> (accessed: 12.09.2010).

7. Petrova M.B., Shestakova V.G., Kharitonova E.A., Pavlova N.V., Kurbatova L.A. Otsenka ehffektivnosti ehlektropunktury pri zazhivlenii polnoslojnogo defekta kozhi s pomoshh'yu ehlektroonnoy mikroskopii // *Teoreticheskie i prakticheskie innovatsii v nauke* (Theoretical and practical innovations in science): materialy Mezhdunar. konf. (Gdansk, 28-30 April 2012). Gdansk, 2012. pp. 14–18.

8. Rabson A., Rojt A., Delvz P. Osnovy meditsinskoj immunologii: uchebnik. M.: Mir, 2006. 320 p.

9. Topchij I.I. Nejtrofily i monotsity pri povrezhdenii sosudistogo ehndoteliya kak zven'ya edinoj patogeneticheskoy tsepi v razvitii khronicheskoy bolezni pochek i ateroskleroza, 2009. – URL: <http://internal.mif-ua.com/archive/issue-6792/article-6834/> (accessed: 11.10.2012).

10. Arora S., Olszewski M.A., Tsang T.M., McDonald R.A., Toews G.B., Huffnagle G.B. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* // *Infection and immunity*. 2011. Vol. 79, no 5. pp. 1915–1926.

11. Ioannidou E. Therapeutic modulation of growth factors and cytokines in regenerative medicine // *Current pharmaceutical design*. 2006. Vol. 12, no 19. pp. 397–408.

12. Lowes K.N., Croager E.J., Olynyk J.K., Abraham L.J., Yeoh G.C. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors // *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2003. Vol. 18, no. 1. pp. 4–12.

13. Mehibel M., Singh S., Chinje E.C., Cowen R.L., Stratford I.J. Effects of cytokine-induced macrophages on the response of tumor cells to banoxantrone (AQ4N) // *Molecular Cancer Therapeutics* May. 2009. Vol. 8, no. 5. pp. 1261–1269.

14. Scull C.M., Hays W.D., Fischer T.H. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets // *Journal of Inflammation*. 2010. 7:53. URL: <http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/53>. (accessed: 16.01.13).

15. Vidal P.M., Lemmens E., Dooley D., Hendrix S. The role of «anti-inflammatory» cytokines in axon regeneration // *Cytokine & growth factor reviews*. 2013. Vol. 24, no. 1. pp. 1–12.

References

1. Dolgushin I.I. Antimikrobnye ehffekty sekretornykh produktov nejtrofilov // *Izvestiya Chelyabinskogo nauchnogo tsentra*. 2001. no 11. pp. 104–106.

2. Egorova V.N., Smirnov M.N. Noveye vozmozhnosti immunoterapii s ispol'zovaniem Ronkolejkina – rekombinantnogo interlejkina-2 cheloveka // *Terra Medica*. 1999. no. 2. pp. 15.

3. Efimenko N.A., Shin F.E., Tolstykh M.P. Sovremennyye tendentsii v sozdanii biologicheskii aktivnykh materialov dlya lecheniya gnojnykh ran // *Voенно-meditsinskij zhurnal*. 2002. no. 1. pp. 48–52.

4. Zlakomanova O.N. Sostoyanie sistemy tsitokinov u detej s travmaticheskoy boleznyu // *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2008. T. 48. no. 2. pp. 65–71.

Рецензенты:

Чекмарёва И.А., д.б.н., заведующая лабораторией электронной микроскопии, ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва;

Дубровин И.А., д.м.н., доцент, профессор кафедры судебной медицины ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 05.12.2013.