

УДК 615.454.1

МЯГКИЕ ФОРМЫ *PENTAPHYLLOIDES FRUTICOSA* L. ПРИ РАНЕВОМ ПОВРЕЖДЕНИИ У БЕЛЫХ КРЫС

Гармаев Б.-Ц.Н.¹, Хитрихеев В.Е.², Бальхаев М.И.¹, Николаева И.Г.²

¹ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» Министерства образования и науки РФ, Улан-Удэ;

²ФГБНУ «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН», Улан-Удэ, e-mail: garmaev.bato@mail.ru

Целью исследования являлось определение ранозаживляющего действия мягких форм из побегов Пятилистника кустарникового на модели плоскостной кожно-фасциальной раны. Эксперименты проводили на белых крысах-самцах, у которых воспроизводили раневой дефект нанесением плоскостных ран размерами 2,0 x 2,0 см. Животным 1-й группы на раны накладывали 5 % линимент Пятилистника кустарникового, полученный на аппарате NanoDeBee 30. Животным 2-й опытной группы применяли препарат сравнения – 5 % мазь Пятилистника кустарникового, произведенной по аптечной технологии. В 3-й группе обработка ран осуществлялась глицерин-вазелиновой мазью. Исследовались биоптаты с зоны ран, взятые на 7, 14 и 21 сутки, обработанные стандартным образом. У животных 1 группы клеточные элементы представлены в основном дифференцированными фибробластами и фиброцитами, отмечается также высокий уровень организации коллагена, что свидетельствует об эффективной стадийности раневого процесса в данном случае. Имеются различия между 1 и 2 группами – в количестве фиброцитов и фибробластов, а также соотношении молодых и зрелых форм коллагенпродуцирующих клеток. Биоптат, полученный у животных 3 группы, только на 21 сутки эксперимента соответствовал картине, близкой наблюдаемой у животных 1 группы на 14 день. Результаты опытов указывают, что применение готовой формы, полученной на аппарате NanoDeBee 30, обеспечивает наиболее раннее формирование рубца по сравнению с мазью, произведенной по аптечной технологии.

Ключевые слова: побеги Пятилистника кустарникового, линимент и мазь, раневой процесс.

SOFT FORMS OF *PENTAPHYLLOIDES FRUTICOSA* L. IN INJURIES IN WHITE RATS

Garmaev B.-Ts.N., Khitrikheev V.E., Balkhaev M.I., Nikolaeva I.G.

¹Buryat State University, Ulan-Ude;

²Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, e-mail: garmaev.bato@mail.ru

The aim of the work was to estimate a wound-healing effect of soft drug products from the *Pentaphylloides fruticosa* L. shoots on the model of planar skin-fascial wound. The liniment was developed with the use of the NanoDeBee 30 device and the ointment was developed with the use of pharmaceutical technology. Experiments were carried out on white male Wistar rats. The skin injury was simulated by inflicting planar wounds 2.0 x 2.0 cm in size. The 5%-liniment and 5% ointment from *P. fruticosa* were put on the wounds of the first and second experimental groups respectively. In the third group the wounds were treated with glycerin-vaseline ointment. Biopstate of the wound surface was taken on the 7th, 14th and 21st day. Histological preparations were studied using standard methods. Cell elements of the first group animals were displayed as fibroblasts and fibrocytes; it was noted high level of collagen organization that testified the effective staging of the wound process in this case. The amount of fibrocytes and fibroblasts and ratio between juvenile and mature forms of collagen-producing cells vary in the first and second groups. Biopsy material obtained from the animals of the third group only on the 21st day corresponded to the picture observed in animals of the 1st group on the 14th day. The findings of the study verify that the use of the product obtained on NanoDeBee device provides the earlier forming of the scar as compared with the ointment developed using pharmaceutical technology.

Keywords: *Pentaphylloides fruticosa* L. sprouts, liniment, ointment, wound process.

В последние годы благодаря достижениям научно-технического прогресса появились перспективы создания эффективных лекарственных препаратов на основе лекарственных растений с использованием технологий, обеспечивающих максимальное извлечение действующих веществ. Одним из источников получения высококачественного средства является *Pentaphylloides fruticosa* L., имеющий обширный ареал, неприхотливый к условиям

среды (растение-мезофит, холодоустойчиво и способно произрастать в условиях вечной мерзлоты). Благодаря насыщенности биологически активными веществами, прежде всего, флавоноидами, танинами, полисахаридами, углеводами, аминокислотами, сапонинами тритерпеноидной группы и другими веществами, извлечения из побегов Пятилистика кустарникового активно используются в традиционной медицине как кровоостанавливающее, противовоспалительное, антибактериальное, гипогликемическое, регенерирующее, обезболивающее средство [2]. Широкий спектр фармакологических эффектов, в частности экстракта из указанного сырья, предопределил целесообразность применения линимента, полученного на его основе по инновационной технологии для лечения раневого процесса, а также мази, изготовленной по классической аптечной технологии.

Цель исследования: определить ранозаживляющее влияние мягких готовых форм из побегов Пятилистика кустарникового на модели плоскостной кожно-фасциальной раны.

Материалы и методы исследования: эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказа №267 МЗ РФ (19.06.2003 г.) на белых крысах-самцах линии Wistar, массой 200–250 гр, у которых воспроизводили раневое повреждение кожи, после предварительной подготовки, путем нанесения плоскостных ран размерами 2,0 x 2,0 см. Протокол исследования одобрен комиссией по этике при институте общей и экспериментальной биологии СО РАН (заключение №17 от 09.07.15 г.). По принципу аналогов было сформировано 3 группы животных, находившихся в равноценных условиях кормления и содержания в виварии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Оптимальное содержание экстракта в мягких формах установлено в предварительных опытах.

Животным 1-й группы на раны накладывали 5 % линимент экстракта побегов Пятилистика кустарникового, полученный на аппарате NanoDeVee 30. Указанное средство в дозе 100 мг наносили на раневой дефект 1 раз в сутки, в течении 14 дней. Животным 2-й опытной группы применяли препарат сравнения – 5 % мазь на основе экстракта побегов Пятилистика кустарникового, произведенной по аптечной технологии, в аналогичной дозе и схеме. В 3-й (контрольной) группе обработка ран осуществлялась в аналогичном режиме глицерин-вазелиновой мазью в соотношении 2:3 (основа мягких форм) в дозе 100 мг.

Для исследований использовали биоптаты с зоны ран, взятые на 7, 14 и 21 сутки. Полученный материал фиксировали в 10 % водном растворе нейтрального формалина. Срезы толщиной 5–7 мкм готовили на санном микротоме с последующей окраской гематоксилином и эозином [5]. Для выявления коллагеновых волокон срезы окрашивали по Ван-Гизону [1]. Гистологические препараты изучали с использованием микроскопа МБИ-3. Обращали

внимание на строение эпителия, сосочкового слоя, дермы, характер формирования сосудов и волосяных фолликулов. Количество клеточных элементов в рубцующейся ткани подсчитывали, используя окулярную сетку. Скорость контракции раневого дефекта на 7, 14 и 21 сутки эксперимента определяли планиметрическим методом: на рану накладывалась прозрачная рентгеновская пленка, на которой маркером фиксировался контур дефекта, площадь контура в квадратных миллиметрах измеряли путем наложения на миллиметровую бумагу (Попова Л.Н., 1942 г.). Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием компьютерной программы “Microsoft Office Excel 2007”. Различия в сравнении данных опытных групп с контролем считали значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты исследований и их обсуждение

У животных первой и второй группы на 7 сутки наблюдения неповрежденный участок ткани, расположенный на расстоянии от раны, имел нормальное строение, характеризующееся правильным расположением стромы, сосудов. В пограничной зоне на этот срок в непосредственной близости от раны видны многочисленные капилляры, которые в зависимости от плоскости сечения имели округлую, овальную или вытянутую форму. В области раны наблюдали значительные разрастания неправильно расположенных пучков коллагеновых волокон, веретенообразных клеток фиброцитов. Следует отметить увеличение вновь образованных капилляров по направлению к поверхности раны. Отчетливо визуализируется активная эпителизация раны, происходящая путем нарастания эпителия на раневую поверхность со стороны сохранившихся клеток с краев раны. Данная картина соответствует классическому пути заживления поверхностной раны (в данном случае плоскостной) [3,9]. Следует отметить, что митозы эпителиальных клеток в области краев ран еще малочисленны, их значительно больше в стороне от краев раневого дефекта. Эпителиальный пласт, покрывающий дефект кожи, состоял из пяти – шести слоев клеток, волоконца имели менее плотную структуру, чем на неповрежденном участке. Сосочки эпидермиса крупнее, чем в зоне без повреждений, неправильной формы. По контурам сосочкового слоя были расположены базальные клетки. Необходимо указать, что четкость стратификации эпидермиса у крыс первой и второй групп выражена значительно лучше, чем в контрольной группе. Дерма в первой группе состояла из формирующих коллагеновых волокон и аморфного вещества, что свидетельствует о начале активной фазы регенерации [6]. Микроскопически определяется четкое отграничение дермы от эпидермиса базальной мембраной, в ней отчетливо заметны кровеносные сосуды. Дерма без резкой границы переходит в подкожную жировую клетчатку. В регенератах на этот период опыта наблюдали производные элементы кожи – волосяные фолликулы и сальные железы. Дерма содержала большое количество артериол и венул. Причем, количество сосудистых элементов в 1 группе

превосходило число артериол и венул во 2 группе и особенно – в контрольной группе. Сочетание в данный период времени процесса контракции раны с интенсивной эпителизацией кожного дефекта подтверждает наиболее эффективное действие линимента на течение раневого процесса.

Через 14 суток эксперимента клеточные элементы в ране у животных 1 группы были представлены в основном фибробластами и фиброцитами. Фибробласты дифференцируются как крупные клетки, чаще вытянутой формы, фиброциты имели более округлую форму. Уровень организации коллагена также высок – сформированные пучки коллагена расположены параллельно и косо направлены к поверхности, они переплетаются друг с другом, главным образом, в горизонтальной плоскости. Данная картина свидетельствует об эффективной стадийности раневого процесса в данном случае [4,8]. Причем, морфологическая картина в 1 и 2 группах на указанный срок опыта уже имеет определенные отличия. Это подтверждает подсчет клеточных элементов и сосудов в раневом биоптате (табл.1). Количество фиброцитов и фибробластов, а также соотношения молодых и зрелых форм коллагенпродуцирующих клеток в 1 группе вкупе с высокой степенью васкуляризации раны свидетельствуют о высоких темпах регенеративных процессов. В дерме количество венул относительно одинаковое в 1 и 2 группах животных, но число артериол максимально высокое в 1 группе, значительно меньшее – во 2 группе, в контрольной группе меньше – в 3 раза.

Течение раневого процесса у крыс контрольной группы характеризовалось замедленными темпами регенеративных процессов. На 21 сутки эксперимента гистологический статус имел следующий вид: эпителиальный пласт, закрывающий раневой дефект лишь на эти сроки, состоял из пяти – шести слоев, они были расположены неравномерно, имелись утолщенные участки, дифференциация эпидермиса на слои была слабо выражена, сосочки базального слоя имели неправильную форму. Дерма состояла из формирующихся коллагеновых волокон с имеющимися участками переплетения, их формирование более выражено ближе к краю дефекта. Необходимо отметить, что в этой группе не наблюдаются производные элементов кожи (волосяные фолликулы и сальные железы).

Таблица 1

Показатели состояния рубцующейся ткани при применении мягких форм из побегов
Пятилистика кустарникового при раневом повреждении кожи у крыс

Показатель	Группы животных		
	1 группа (линимент), 14 сутки (n=8)	2 группа (мазь), 14 сутки (n=8)	3 (основа) группа, 14 сутки (n=8)

Фибробласты	48,8±0,85*	42,7±0,54*	37,2±1,14
Фibroциты	114,5±0,65*	112,3±0,62*	90,1±1,11
Венулы	52,1±0,90*	43,4±0,32	46,3±0,65
Артериолы	69,2±0,71*	46,3±0,65*	23,3±1.12

* – здесь и далее означает, что различия по сравнению с контролем значимы ($P < 0,05$); n – количество животных в группе.

Указанные данные согласуются с результатами планиметрии. Данные наблюдений, представленные в таблице, свидетельствуют, что на всех сроках исследования площади ран у крыс, получавших лечение 5 % линиментом экстракта побегов Пятилистика кустарникового, полученного на аппарате NanoDeBee30, сокращаются (табл. 2).

Таблица 2

Влияние линиментов Пятилистика кустарникового на величину площади плоскостной раны у белых крыс

Сутки эксперимента	Площадь ран, мм ²		
	Линимент Пятилистика кустарникового, изготовленный на аппарате NanoDeBee30	Линимент Пятилистика кустарникового, произведенного по аптечной технологии	Глицерин-вазелиновая основа (контроль)
7	245.0±2.30* (n=8)	287,0±4.80 (n=9)	325,0±4.83 (n=8)
14	95.8±4.20* (n=8)	141,0±5.05 (n=8)	187.0±3.40 (n=8)
21	50.0±3.71* (n=8)	75.0±2.97* (n=8)	145.0±5.80 (n=8)

Так, в серии опытов, где у крыс, которым применяли линимент Пятилистика кустарникового, изготовленного на аппарате NanoDeBee30, площадь раневой поверхности была на 24,62 % меньше, чем у крыс, которым применяли глицерин-вазелиновую основу мази, на 14 сутки эксперимента разница составляла уже 48,78 %, а на 21 сутки площадь ран у крыс при применении линимента Пятилистика кустарникового, изготовленного на аппарате NanoDeBee30, уменьшилась более чем на 2/3 в сравнении с контролем. Показатели динамики ранозаживления у животных с аптечной формой линимента на основе Пятилистика кустарникового также демонстрировали позитивный эффект лечения. В

частности на 14 сутки опыта плоскостная рана уменьшилась на 24,6 % относительно контроля, а на 21 сутки разница в площади составила 48,27 %.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют, что применение готовой формы линимента экстракта Пятилистника кустарникового, полученного на аппарате NanoDeVee 30, обеспечивает наиболее раннее заживление и формирование рубца по сравнению с мазью, произведенной по аптечной технологии. Биоптат, полученный у животных 3 (контрольной) группы, только на 21 сутки эксперимента соответствовал картине, близкой наблюдаемой у животных 1 группы на 14 день. Несомненная эффективность линимента с частицами, близкими к наноформе, обуславливающая ускоренное заживление раневого дефекта, делает данную готовую форму перспективной для применения в качестве эффективного ранозаживляющего средства в клинике.

Список литературы

1. Жукова О.В., Потекаев Н.Н., Стенько А.Г., Бурдина А.А. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи // Клиническая дерматология и венерология. – 2009. – № 3. – С. 4-9.
2. Кошевенко Ю.Н. Кожа человека. – М., 2008. – С. 227-315.
3. Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция / Руководство для врачей. – М., 1990. – 688 с.
4. Луцевич О.Э., Тамразова О.Б., Шикунова А.Ю., Плешков А.С., Исмаилов Г.И.-О., Воротилов Ю.В., Толстых П.И. Современный взгляд на патофизиологию и лечение гнойных ран // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2011. – № 5. – С.72-77.
5. Меркулов Г.В. Курс патогистологической техники / Г.В. Меркулов. – М.: Медицина, 1969. – 424 с.
- Николаева И.Г., Хобракова В.Б., Арьяева М.М. Пятилистник кустарниковый. – Улан-Удэ, 2001. – 110 с.
6. Сергиенко В.И., Бондаренко И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М., 2006. – 256 с.
7. Шафранов В.В., Короткий Н.Г., Таганов А.В., Борхунова Е.Н. Келоидные и гипертрофические рубцы: клинико-морфологические параллели // Журн. детская хир. – 1998. – № 4. – С. 30-34.