УДК 616-001.4-08

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L-ГЛУТАМИЛ - L-ТРИПТОФАНА

Петленко И.С.[1], Егорова Т.Ю.[1], Петленко С.В.[2], Безгодков Ю.А.[1], Воронцова Т.Н.[3]

[1]ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: iouri6222@gmail.com;
[2]ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, e-mail: petlenko@mail.ru;
[3]ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: vorontsova-omorniito@yandex.ru

Количество пациентов с незаживающими ранами возрастает год от года. Наряду с наличием различных заболеваний причиной их формирования у данных больных считают нарушения местной и общей иммунологической реактивности, приводящие к развитию хронического воспаления. Однако действие и механизмы биологической активности препаратов иммунокорректоров, в том числе «Тимоген», изучены недостаточно. В процессе работы проводили экспериментальное исследование влияния препарата «Тимоген» (L - глутамил – L - триптофана мононатриевая соль) в сравнении с препаратом «Актовегин» на процесс заживления экспериментальной неэпителизирующейся раны, активность матриксных металлопротеаз ММП-1, ММП-2, ММП-8 и ММП-9 в раневом отделяемом, образование грануляционной ткани в динамике раневого процесса. Показано, что влияние исследуемых препаратов является разнонаправленным. «Тимоген» ускоряет закрытие кожной раны, ингибирует активность матриксных металлопротеаз в раневом отделяемом экспериментальных животных (кроликов), что препятствует чрезмерному разрушению тканей раны при резорбции поврежденной ткани посредством данных ферментов, но замедляет процесс созревания грануляционной ткани. Перспективным следует считать применение препарата «Тимоген» в комплексном лечении ран, особенно диабетических язв преимущественно на начальном этапе заживления.

Ключевые слова: рана, воспаление, иммунотерапия, матриксные металлопротеазы.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE SPECIFIC ACTIVITY OF L-GLUTAMYL - L-TRYPTOPHAN

Petlenko I.S.[1], Egorova T.Y.[1], Petlenko S.V.[2], Bezgodkov Y.A.[1], Vorontsova T.N.[3]

[1]Saint-Petersburg state pediatric medical university, Saint-Petersburg, e-mail: iouri6222@gmail.com;
[2]Institute of toxicology, Saint-Petersburg, e-mail: petlenko@mail.ru;
[3]Russian scientific research institute of traumatology and orthopedics n.a. R.R.Vreden, Saint- Petersburg, e-mail: vorontsova-omorniito@yandex.ru

The number of patients with non-healing wounds increases from year to year. Along with the presence of various diseases, the cause of their formation in these patients is considered to be failure of local and general immunological reactivity, leading to the development of chronic inflammation. However, the action and mechanisms of biological activity of immunocorrectors including "Timogen" have not been studied enough. During the work, the effect of "Timogen" (L - glutamyl – L - tryptophan monosodium salt) in comparison with "Actovegin" on the healing process of experimental non-epithelialised wound, the activity of matrix metalloproteases MMP-1, MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in the wound discharge, the formation of granulation tissue in the dynamics of the wound process were experimentally studied. It is shown that the effect of the studied drugs is different. "Timogen" accelerates the closure of the skin wound, inhibits the activity of matrix metalloproteases in wound discharge of experimental animals (rabbits), which prevents excessive destruction of wound tissue by resorption of damaged tissue through these enzymes, but slows down the process of maturation of granulation tissue. Promising should be considered the application of "Timogen" in the complex treatment of wounds, especially diabetic ulcers, especially at the initial stage of healing.

Keywords: wound, inflammation, immunotherapy, matrix metalloprteases.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в медицине в последние десятилетия, проблема лечения длительно незаживающих ран, трофических нарушений кожи, пролежней далека от своего полного решения [1-3]. Количество пациентов с

незаживающими ранами возрастает год от года. Это связывают с увеличением заболеваемости диабетом, формированием иммунологических и обменных нарушений, а также увеличением количества хирургических вмешательств [4; 5]. Наряду с наличием различных заболеваний причиной формирования незаживающих ран у этих больных считают нарушения местной и общей иммунологической реактивности, приводящие к развитию хронического воспаления, сопровождающегося усиленной секрецией провоспалительных цитокинов, изменением активности матриксных металлопротеаз (ММП), снижением продукции факторов роста, что в целом тормозит процессы регенерации и ранозаживления [6]. Данные литературы свидетельствуют о том, что L-глутамил- L-триптофан («Тимоген») оказывает модулирующее влияние на метаболические процессы, стимулирует функциональную активность клеток иммунной системы, обладает антиоксидантным действием, стимулирует процессы регенерации тканей, ускоряет заживление ран, активизирует функции клеток соединительной ткани, эндотелиоцитов, макрофагов и лейкоцитов в очаге повреждения, ингибирует продукцию гистамина и серотонина при воспалении [7]. В доклинических испытаниях показана способность «Тимогена» улучшать ранозаживление. Однако терапевтическое действие и механизмы биологической активности препарата «Тимоген» изучены недостаточно.

Цель исследования: изучить эффективность и клеточные механизмы синтетического аналога регуляторного пептида тимуса L-глутамил- L-триптофана препарата «Тимоген» (L-глутамил - L-триптофана мононатриевая соль) и препарата сравнения «Актовегин» на заживление неэпителизирующихся ран экспериментальных животных.

Задачи исследования: определить в динамике влияние препаратов «Тимоген» и «Актовегин» на 1) площадь эпителизации и время закрытия ран, 2) протеолитическую активность раневого экссудата путем определения активности ММП, 3) гистоморфологические процессы реэпителизации на момент полной эпителизации раны.

Материал и методы исследования

В асептических условиях паравертебрально у кролика формировали дефект кожи, подкожной клетчатки, поверхностной и собственной фасций круглой формы диаметром 22 мм, края кожи подшивали к краю силиконового кольца [8]. Рану укрывали стерильной повязкой. Раз в 3 суток под наркозом осуществляли перевязки, туалет раны, сбор раневого отделяемого для оценки активности ММП. После выведения животных из опыта рану иссекали для гистологического исследования**.**

Животным с 1-го по 21-й день после моделирования патологии внутрибрюшинно вводили 5,0 мл препарата «Тимоген» (группа 1, n=3), 5,0 мл препарата «Актовегин» (группа 2, n=3), 5,0 мл раствора хлорида натрия 0,9% (группа 3, n=3).

Площадь ран измеряли каждые 3 суток методом фотофиксации и рассчитывали индекс эпителизации раны в процентах от первоначальной площади раны.

Время закрытия ран определяли как интервал, необходимый для прекращения получения раневого отделяемого из-за полного высыхания поверхности раны. На каждом животном моделировали 4 раны, которые могли закрываться не одновременно, а результат рассчитывался как средняя величина.

Наличие, а также активность ММП (ММП-1, ММП-2, ММП-8 и ММП-9) в пробах раневого экссудата оценивали методом зимографии на желатине и на казеине на 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 и 24-й день от начала эксперимента [9; 10].

Гистоморфометрическое исследование проводили для всех животных, из расчета 1 рана - 1 препарат. Материал из дна раны фиксировали в 10% растворе формалина для морфологического изучения. Готовили гистологические препараты с окраской гематоксилин-эозином. Осуществляли описательную микроскопию, оценивая изменение площади раны и состояние грануляционной ткани дна раны. Для количественной оценки выделяли несколько параметров: интенсивность нейтрофильной инфильтрации, наличие периваскулярного отека, гигантских эпителиоидных клеток и геморрагических очагов, характеризующих остроту воспалительной реакции, количество и состояние сосудов грануляционной ткани, отражающие скорость формирования грануляционной ткани и завершенность процесса эпителизации раны. Состояние грануляционной ткани оценивали полуколичественным способом (0 - отсутствие параметра, 1 – малое количество, 2 – среднее количество, 3 – большое количество). Размеры гистологических элементов оценивали микроскопом «ЛЮМАМ - И3» с увеличением 400х. Количество и размеры гистологических элементов на каждом микропрепарате подсчитывали в 10 полях зрения, выбранных случайно в пределах 2000 мкм от дна (просвета полости) раны, но выше неизмененных тканей.

Результаты представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения. Установлено что, согласно критерию Лиллиефорса, распределение показателей соответствует нормальному. Различия оценивались с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Площадь ран на 21-е сутки в группе 1 после применения «Тимогена» составила 18,3±1,9% от исходной, что было существенно, на 21,1%, меньше по сравнению с группой 2 после применения «Актовегина» (39,4±2,2%) и на 13,3% относительно группы 3 (31,6±2,4%). «Тимоген» способствовал достоверному ускорению уменьшения площади раны, в то время как введение «Актовегина» приводило даже к некоторому замедлению сокращения площади раны.

Время закрытия экспериментальных ран в группе 1 после применения «Тимогена» (18

суток) было существенно, на 6 суток, меньше по сравнению с группой 2 (больше 24 суток) и группой 3 (больше 24 суток).

Сбор проб для определения активности ММП в раневом отделяемом проводили до момента высыхания раны, что и считали моментом ее закрытия. При расчете уровня активности исходным считали уровень ММП в крови данного животного, взятой в нулевые (0) сутки в начале эксперимента. Снижение активности ММП до 0 означает снижение активности до исходного уровня. Динамика активности желатиназ в контрольной группе 3 соответствовала стандартному течению заживления раны. Введение препарата «Актовегин» сопровождалось снижением активности ММП после 6 суток, сглаживая пик повышения активности, связанный с изменением клеточного фона раны, при этом закрытие раны не было завершено на 24-е сутки. Введение препарата «Тимоген» приводило к повышению активности ММП до 9 суток, после чего активность снижалась, и рана закрывалась быстрее (на 21-е сутки), чем при введении препарата сравнения и в контрольной группе (таблица 1).

Таблица 1

Суммарный уровень активности ММП (желатиназы) в группах

Сроки исследования (сутки)	Активность ММП (желатиназы) в раневом отделяемом (отн. ед.) в группах сравнения (вводимые препараты)		
	Группа 1 «Тимоген»	Группа 2 «Актовегин»	Гррупа 3 «Контроль»
0	3200±620	1200±190	2300±280
3	5500±760	4200±800	3800±640
6	5000±880	4000±670	4100±640
9	5700±910	3800±600	4200±630
12*	4000±650	3900±600	5500±680
15	3200±570	3700±550	2800±400
18	2300±370	2900±380	2000±380
21	0±0**	1000±130	1700±270
24	0±0***	1000±140	0±0

* - извлечение пластикового кольца. ** - достоверные отличия группы 1 относительно групп 2 и 3 ($p \leq 0,05$). *** - достоверные отличия групп 1 и 3 относительно группы 2 ($p \leq 0,05$).

Динамика активности коллагеназ в контрольной группе 3 соответствовала стандартному процессу заживления раны. Введение препарата «Актовегин» приводило к снижению активности ММП, сглаживая пики повышения активности до 12 суток, после чего активность ММП была выше, чем в контроле, что приводило к более раннему прекращению действия коллагеназ в экспериментальной ране на 21-е сутки. Введение «Тимогена» приводило к некоторому снижению общей активности ММП в течение всего раневого процесса и быстрому снижению активности ММП до начального уровня в более ранние сроки (на 18-е сутки), чем в остальных группах (таблица 2).

Раздельный учет динамики активности коллагеназ и желатиназ в процессе заживления экспериментальной раны по изоформам (ММП-2 и ММП-9 – желатиназы; ММП-8 и ММП-1

– коллагеназы) выявил следующие особенности, обусловленные введением различных препаратов (таблицы 3, 4).

Таблица 2

Суммарный уровень активности ММП (коллагеназы) в группах

Сроки исследования (сутки)	Активность ММП (коллагеназы) в раневом отделяемом (отн. ед.) в группах сравнения (вводимые препараты)		
	Группа 1 «Тимоген»	Группа 2 «Актовегин»	Группа 3 «Контроль»
0	600±110	2000±370	500±80
3	3200±610	2500±440	4500±810
6	4700±870	3700±680	5300±830
9	4500±830	3600±610	4500±740
12*	3000±590	3500±590	5000±890
15	3200±640	4200±710	2100±330
18	0±0**	3400±600	1800±240
21	0±0**	100±17	2000±290
24	0±0	0±0	0±0

* - извлечение пластикового кольца. ** - достоверные отличия группы 1 относительно групп 2 и 3 ($p \leq 0,05$).

В контрольной группе динамика активности ММП-2/ММП-9 соответствовала обычному профилю данных ферментов в процессе заживления раны - то есть отмечалось повышение ее активности на 9-12/3-9 сутки после моделирования раны с падением активности до нулевых значений. Введение животным препарата сравнения «Актовегин» снижало активность ММП-2/ММП-9, способствуя сглаживанию пиковой активности после 6/12 суток, а непосредственно после 15 суток наблюдения активность ММП-2/ММП-9 была практически идентична динамике уровня фермента в контрольной группе. Введение препарата «Тимоген» приводило к некоторому общему снижению активности ММП-2/ММП-9 и сглаживанию пиков активности, при этом уровень активности ММП-2/ММП-9 снижался до исходного уровня быстрее (на 21 сутки), чем в других группах (на 24-е сутки).

Таблица 3

Динамика активности изоформ желатиназ (ММП-2 и ММП-9) в группах

Сроки исследования (сутки)	Активность ММП (желатиназы) в раневом отделяемом (отн. ед.)					
	Группа 1 «Тимоген»		Группа 2 «Актовегин»		Группа 3 «Контроль»	
	ММП-2	ММП-9	ММП-2	ММП-9	ММП-2	ММП-9
0	1900±220**	700±90	700±110	300±50	800±90	700±90
3	1700±220	2400±340	1300±200	2300±400	1000±150	3800±540
6	1500±180	2500±300	1700±230	2200±270	1600±210	3600±430
9	1800±160	3700±420	1300±160	2400±310	1700±180	3400±380
12*	1300±180	2000±300	1300±200	2600±240	2500±330	3000±270
15	1200±190	1900±260	1200±130	2000±190	1300±180	1800±250
18	800±90	1500±210	800±100	1700±190	1000±110	1300±130
21	0±0**	0±0**	500±70	1000±120	800±80	1000±110
24	0±0***	0±0***	500±70	1000±100	0±0	0±0

* - извлечение пластикового кольца. ** - достоверные отличия группы 1 относительно групп 2 и 3 ($p \leq 0,05$); *** - достоверные отличия групп 1 и 3 относительно группы 2 ($p \leq 0,05$).

При отсутствии специфической терапии (контроль) динамика активности ММП-1/ММП-8 соответствовала классическим канонам заживления раны, то есть повышение ферментативной активности достигало максимума на 12/3 сутки после моделирования раны с постепенным литическим снижением до нулевых значений в дальнейшем ходе процесса. Системное введение препарата «Актовегин» приводило к резкому угнетению активности ММП-1/ММП-8 на 9/3 сутки, которое с небольшими колебаниями сохранялось вплоть до окончания процесса. Применение препарата «Тимоген» также приводило к достоверному по сравнению с контрольной группой снижению активности ММП-1/ММП-8 и последующему более быстрому прекращению действия этих изоформ коллагеназы (таблица 4).

Таблица 4

Динамика активности изоформ коллагеназ (ММП-1 и ММП-8) в группах

Сроки исследования (сутки)	Активность ММП (коллагеназы) в раневом отделяемом (отн. ед.)					
	Группа 1 «Тимоген»		Группа 2 «Актовегин»		Группа 3 «Контроль»	
	ММП-1	ММП-8	ММП-1	ММП-8	ММП-1	ММП-8
0	300±40	200±40	400±50	700±40	250±30	250±30
3	1400±180**	1400±140**	1000±110	900±130	150±20	2600±430
6	2300±300**	1800±250**	1700±240	1400±190	1000±120	2300±310
9	1800±270	2000±330	1500±210	1800±270	2400±310	2100±300
12*	1000±100**	1200±220**	1600±270	1400±230	3000±440	2000±320
15	1200±210	1000±170	1600±290	1100±200	700±100	800±90
18	0±0**	0±0	1000±150	900±90	500±70	250±20
21	0±0**	0±0**	0±0	300±50	500±90	500±80
24	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

* - извлечение пластикового кольца. ** - достоверные отличия группы 1 относительно групп 2 и 3 ($p \leq 0,05$).

Результаты гистологического исследования показали, что толщина лейкоцитарно-некротического слоя после введения препаратов «Тимоген» и «Актовегин» была меньше, чем в контрольной группе, что указывает на более слабую инфильтрацию воспалительных клеток. Периваскулярный отек был минимальным в контроле. Количество геморрагических очагов во всех группах статистически не отличалось. Количество расширенных полнокровных сосудов было достоверно минимальным для препарата «Тимоген» ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими группами наблюдения. Степень эозинофилии была минимальной для препарата «Актовегин».

Результаты подсчета гистологических элементов показали, что эпителизация лучше всего проходила в случае введения препаратов сравнения («Тимоген» и «Актовегин») по сравнению с контрольной группой. Грануляционная ткань была сформирована во всех трех

группах. Однако состояние и количество сосудов грануляционной ткани при введении препаратов сравнения было ниже, чем в контрольной группе. При этом созревание грануляционной ткани прошло нормально в группах с использованием «Актовегина» и в контроле. При использовании «Тимогена» грануляционная ткань была незрелой, с разной степенью задержки развития.

Толщину и длину слоя молодого эпидермиса измеряли в мкм на гистологических образцах тканей раны. При этом слой эпидермиса при введении препаратов сравнения покрывал практически всю поверхность среза ткани раны, а в контрольной группе - только часть его.

Заключение

Результаты проведенного исследования позволяют утверждать, что влияние исследуемых препаратов является разнонаправленным.

Площадь раны сокращалась быстрее при введении препарата «Тимоген» и медленнее при введении препарата «Актовегин».

Эпителизация раны шла быстрее при введении обоих исследуемых препаратов, но состояние грануляционной ткани и ее созревание было замедленным.

Динамика активности ММП во всех случаях статистически отличалась от хода нормального заживления раны (контроля). Профили активности ММП при введении исследуемых препаратов были сглаженными, отсутствовали резкие подъемы активности, имеющиеся в контроле. При этом снижение уровня активности до исходного при введении препарата «Тимоген» происходило раньше, чем при введении физиологического раствора и препарата «Актовегин».

«Тимоген» ингибирует действие ММП, что препятствует чрезмерному разрушению тканей раны при резорбции поврежденной ткани посредством данных ферментов (ММП-8 и ММП-9). Но при таком ингибировании созревание грануляционной ткани происходит позже, так как ММП в этом процессе также принимают активное участие (ММП-2 и ММП-1). Именно этот феномен и наблюдался в поставленном эксперименте.

Для ускорения улучшения созревания грануляционной ткани и заживления раны, возможно, будет достаточно использование «Тимогена» только на начальном этапе заживления раны, до начала созревания новообразованной грануляционной ткани. При этом необходимо изучить концентрационные зависимости исследуемого препарата, способные только частично ингибировать ММП.

Повышенное содержание ММП характерно для диабетических язв. Именно в этом случае необходима нормализация состояния раны, для чего возможно применение препарата «Тимоген» в качестве ингибитора ММП.

На последующих этапах лечения возможно внесение дополнительных компонентов - белков внеклеточного матрикса или их фрагментов для создания матрикса, способного удерживать клетки, а также для лучшей адгезии клеток ткани пациента к раневому ложу и дальнейшей их пролиферации [11; 12]. Вносимые белки внеклеточного матрикса будут также основой для синтеза грануляционной ткани, не разрушаемой при пониженной активности ММП.

Список литературы

1. Богопольская А.С., Воронцова Т.Н., Вебер Е.В., Безгодков Ю.А. Современное состояние проблемы лечения пострадавших с переломами в области проксимального отдела бедренной кости // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 2. [Электронный ресурс]. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26177 (дата обращения: 23.05.2019).
2. Вебер Е.В., Воронцова Т.Н., Богопольская А.С., Безгодков Ю.А. Маршрутизация взрослых пациентов с патологией тазобедренного и коленного суставов // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 2. [Электронный ресурс]. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26314 (дата обращения: 23.05.2019).
3. Федотов А.Л., Безгодков Ю.А., Воронцова Т.Н. Современное состояние вопроса оказания помощи пациентам с переломами и переломовывихами в голеностопном суставе // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2014. Т. 173. № 3. С. 107-110.
4. Удовиченко О.В., Грекова Н.М. Диабетическая стопа. М.: Практическая медицина, 2010. 272 с.
5. Schultz G.S., Barillo D.J., Mozingo D.W., Chin G.A. Wound bed preparation and a brief history of TIME. International Wound Journal. 2004. vol. 1. No 1. P. 19-32.
6. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. Nature. 2008. vol. 453. No 7193. P. 314-321.
7. Смирнов В.С. (Ред.) Клиническая фармакология тимогена. СПб.: ФАРМин-декс, 2012. 106 с.
8. Нузова О.Б. Клинические и морфофункциональные особенности репаративной регенерации трофических язв нижних конечностей при их комплексном лечении с местным использованием милиацила и физических методов: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Оренбург, 2010. 45 с.
9. Соловьева Н.И., Рыжакова О.С. Методы определения активности матриксных металлопротеиназ (ММП) // Клиническая и лабораторная диагностика. 2010. Т. 2. № 17. С. 21.
10. Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Цветкова И.В.

Экспрессия желатиназ А и В и эндогенных регуляторов их активности в иммортализованных и трансформированных фибробластах // Биомедицинская химия. 2009. Т. 55. № 4. С. 441-450.
11. Зиновьев Е.В., Асадулаев М.С., Комиссаров И.А., Шемет М.В., Юдин В.Е., Шабунин А.С., Смирнова Н.В., Крюков А.Е., Лукьянов С.А., Стояновский Р.Г., Шалоня Т.А., Арцимович И.В., Костяков Д.В. Возможность применения низкотемпературной атмосферной плазмы и биополимерных раневых покрытий для лечения ожогов кожи III степени (экспериментальное исследование) // Педиатр. 2017. Т. 8. № 3. С. 23-31.
12. Зиновьев Е.В., Юдин В.Е., Асадулаев М.С., Цыган В.Н., Костяков Д.В., Шабунин А.С., Смирнова Н.В., Крюков А.Е., Панеях М.Б., Лукьянов С.А., Арцимович И.В., Лопатин И.М., Зубов В.В., Крылов П.К., Вагнер Д.О., Османов К.Ф., Багатурия Г.О. Опыт применения стволовых клеток при лечении ожогов кожи // Педиатр. 2018. Т. 9. № 4. С. 12-27.