

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

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И СУБКЛЕТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
РЕГЕНЕРАТА КОЖИ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ  
ЦИТОКИНОВ**

*ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России*

*Проведена оценка эффективности влияния комплекса природных цитокинов «Суперлимф» на раневой процесс в коже белых крыс, применяемого местно сразу после нанесения раны и 5 последующих дней. Установлено, что аппликации препарата активизируют хемотаксис нейтрофилов уже с первых часов репаративного процесса. Выявлено усиление фагоцитоза макрофагов, что способствует антибактериальной защите организма. Ультраструктурные изменения макрофагов отражались признаками функционального возбуждения их фагоцитарного аппарата.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *цитокины, раневой процесс, воспаление, нейтрофильные лейкоциты, макрофаги.*

**REGENERAT'S CYTOLOGIC AND SUBCELLULAR CHANGES OF  
THE SKIN IN THE CONDITIONS OF APPLICATION OF  
CYTOKINES**

M. B. Petrova, E.A. Haritonova, N. V. Pavlova

Tver State medical academy

*The assessment of efficiency of influence of a complex of natural cytokines "Superlimf" on a wound process in a skin of the white rats, applied mestno right after drawing a wound and is carried out 5 next days. It is established that applications of a preparation activate a chemotaxis of neutrophils from*

*the first hours of reparativny process. Intensifying of a phagocytosis of macrophages that promotes antibacterial protection of an organism is taped. Ultrastructural changes of macrophages were reflected by signs of functional exaltation of their phagocytic device.*

**KEYWORDS:** *cytokines, wound process, inflammation, neytrofilny leucocytes, macrophages.*

**Введение.** Проблема заживления ран на протяжении многих лет является актуальной, несмотря на то, что уже исследованы и внедрены в клинику множество фармакотерапевтических средств, активизирующих регенерацию и репарацию. Успехи современной молекулярной биологии и генетики позволили существенно расширить сферу поиска новых лекарственных препаратов. В последние годы с развитием молекулярных подходов в изучении механизмов иммунитета, возрос интерес к иммунотерапии.

Невосприимчивость организма к патогенным факторам окружающей среды реализуется врожденными и приобретенными факторами иммунитета. Регуляция иммунного ответа осуществляется через взаимодействие клеточного и гуморального звеньев. Одним из значимых составляющих гуморального звена являются специфические низкомолекулярные белки – цитокины. К цитокинам относятся несколько семейств пептидов: колониестимулирующие факторы, интерлейкины, факторы некроза опухолей, интерфероны, трансформирующие факторы роста. Большинство этих медиаторов синтезируются только в ответ на антигенную стимуляцию и влияют на пролиферацию, дифференцировку, активацию и хемотаксис клеток-

мишеней. В организме человека цитокины действуют пара- и аутокринно.

Действие интерлейкинов реализуется по сетевому принципу, поскольку передаваемая информация содержится не в индивидуальном пептиде, а их наборе. Эти регуляторные молекулы индуцируют синтез друг друга, модулируя набор поверхностных клеточных рецепторов, и могут взаимодействовать как синергисты и антагонисты.

В свете этих данных представляется интересным изучение действия комплекса природных цитокинов «Суперлимф» на процессы посттравматической регенерации.

«Суперлимф» представляет собой стандартизованный естественный комплекс природных иммунопептидов молекулярной массой менее 40 000 Да, секретируемых лейкоцитами периферической крови свиньи. «Суперлимф» содержит такие цитокины как интерлейкины IL-1, IL-2, IL-6, факторы ингибирующие миграцию фагоцитов, некроза опухоли, трансформирующий фактор роста. Препарат выпускается в стерильном лиофилизированном виде в ампулах, содержащих 0,1 мг активного вещества и 5 мг стабилизатора полиглюкина. «Суперлимф» (производство ООО «Центр иммунотерапии «Иммунохелп», Россия, регистрационное удостоверение №РМ002447/01-2003 выдано Министерством здравоохранения РФ от 12.05.2003 г.) предназначен для местного и наружного применения.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 120 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

мм<sup>2</sup> на спинной поверхности тела. Крысы были разделены на две серии. I (опытную) серию 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 - сразу после операции. На раны крыс II (контрольной) серии наносили физиологический раствор по той же схеме. Эффективность действия «Суперлимфа» оценивалась визуально, скорость заживления ран измерялась планиметрическим методом. Для оценки воспалительной фазы регенерации с помощью морфологических методик исследовались мазки-отпечатки, взятые в участке повреждения через 6, 12 и 24 часа наблюдения после нанесения дефектов. Мазки подсушивались на воздухе, фиксировались метиленовым синим по Май-Грюнвальду и окрашивались азур-эозином согласно методике Романовского. Количество нейтрофилов и макрофагов подсчитывалось в световом микроскопе в 10 полях зрения при 1000-кратном увеличении.

Для изучения морфологических изменений макрофагов на ультраструктурном уровне на третьи сутки после операции брались биоптаты, которые фиксировались в глутаровом альдегиде, заливались в аралдит и изучались под электронным микроскопом LVEM5.

**Результаты исследования и дискуссия.** У животных I серии при применении Суперлимфа рубец образовался к 13 дню после нанесения раневого дефекта, тогда как у контрольной серии животных к 15 дню еще сохранялся струп средней площадью 4 мм<sup>2</sup>.

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 являлись единичными в поле зрения. Наряду с этим, обращало на себя внимание отличие в качественных и количественных характеристиках клеточных элементов раневого экссудата у животных разных экспериментальных серий (рис. 1 и 2).

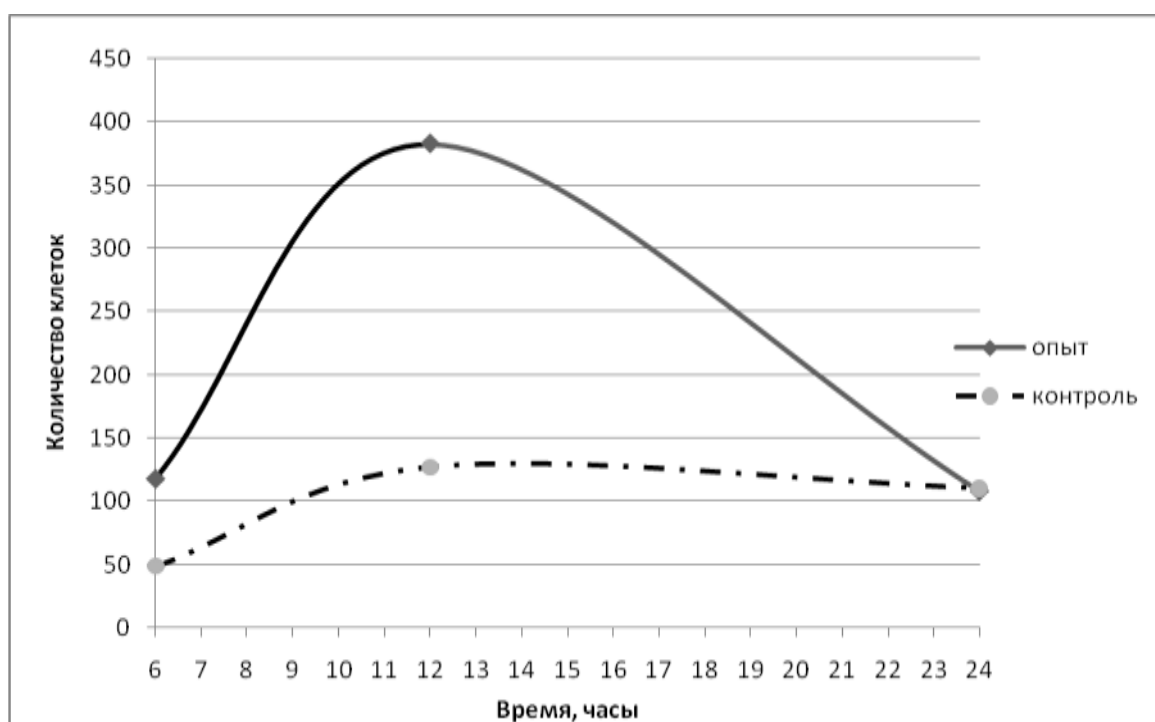


Рис. 1. Динамика изменения количества нейтрофилов (в 10 полях зрения)

У животных I серии нанесение препарата «Суперлимф» непосредственно после операции вызывало более активную миграцию нейтрофилов и макрофагов в рану. Через 6 часов после операции у крыс на фоне применения комплекса цитокинов в раневом экссудате нейтрофилов в 2,4 раза больше, чем у животных контрольной серии. К этому же времени в цитограммах обнаруживались единичные макрофаги – ключевые клетки репаративного процесса. В цитограммах

крыс первой серии насчитывалось  $4,5 \pm 0,6$  этих клеток против  $1,2 \pm 0,3$  в плацебо группе (рис. 2). Микроорганизмы заселяли раневое поле и находились вне- и внутриклеточно у животных обеих серий опыта.

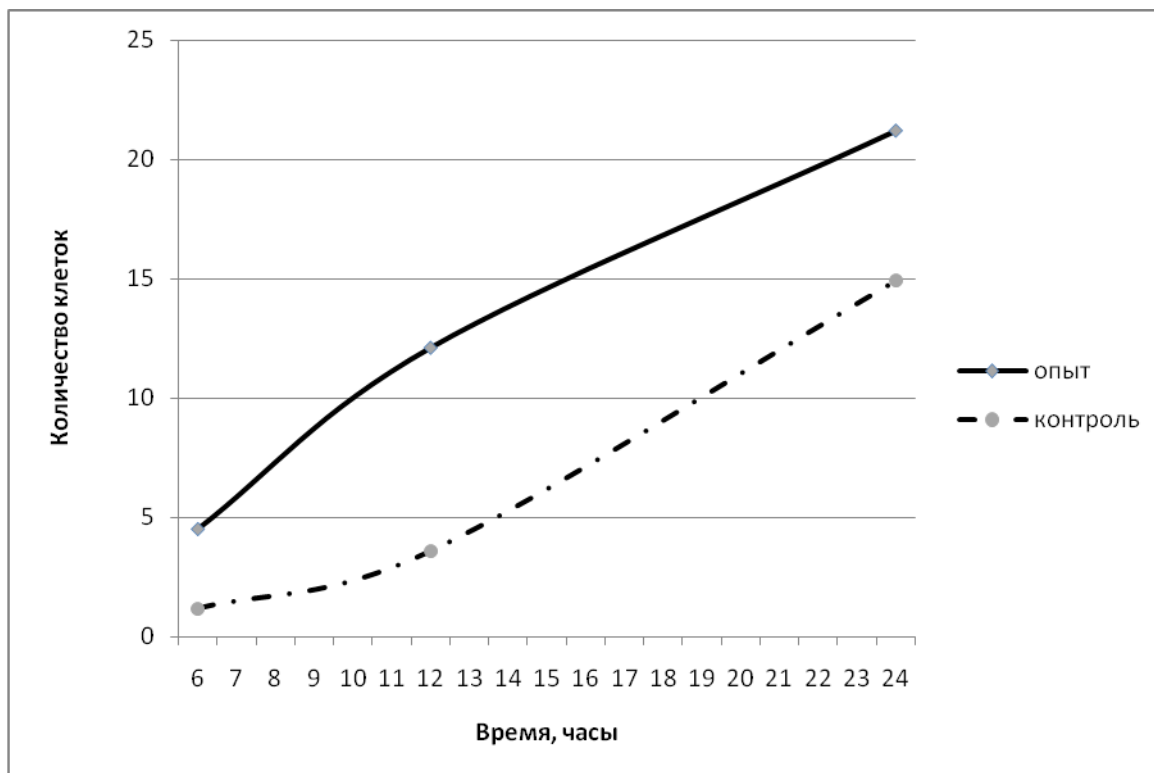


Рис. 2. Динамика изменения количества макрофагов (в 10 полях зрения)

Через 12 часов после нанесения дефекта в отделяемом ран количество нейтрофилов у животных первой серии увеличилось в 3,2 раза до  $382,7 \pm 31,2$  клеток, в то время как у крыс без лечения увеличение произошло в 2,6 раза и составляло лишь  $127,1 \pm 22,3$  клеток. Количество макрофагов возросло до  $12,1 \pm 1,2$  против  $3,6 \pm 0,3$  в контроле. К этому времени в цитограммах крыс первой серии микроорганизмы встречались только в единичных полях зрения и преимущественно внутриклеточно. В отделяемом ран контрольных животных микробная флора обнаруживалась в основном внеклеточно в среднем в 7 полях зрения из 10.

К концу первых суток наблюдения активность воспалительного процесса у крыс первой серии резко снизилось, на что указывало значительное уменьшение нейтрофильных гранулоцитов до  $108,1 \pm 18,3$ ; 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 серий, но при применении «Суперлимфа» их насчитывалось в 1,4 раза больше, чем в контрольной. Дальнейшее цитологическое исследование (через 24 часа после нанесения раны) не представлялось возможным из-за образования струпа, своеобразной «биологической повязки», защищающей подлежащие ткани от вредного воздействия окружающей среды и предотвращающей потерю тканевой жидкости.

Исследование биоптатов регенерирующей ткани крыс I серии под электронным микроскопом показало, что значительное количество нейтрофилов находилось в состоянии некроза, о чем свидетельствовали поврежденная цитоплазматическая мембрана и стертый рисунок ядерного хроматина клеток. Ультраструктурные изменения макрофагов отражались признаками функционального возбуждения - их набуханием, увеличением объема ядер. Ядерный хроматин был равномерно распределен по всей площади ядра, ядрышки располагались эксцентрично. Каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума значительно расширены, отмечались признаки активации фагоцитарного аппарата. В их цитоплазме наблюдались скопления большого числа вторичных лизосом, обнаруживалось много остаточных телец.

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. 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 способствуют антибактериальной защите организма. В работах обосновывается мнение о том, что такие цитокины, как TNF- $\alpha$ , IL-1 и IL-6 вызывают ряд морфологических и молекулярных изменений, приводящих к индукции притока мононуклеарных фагоцитов в очаг поражения и, как следствие, локализацию воспаления.

Таким образом, влияние аппликаций «Суперлимфа» на течение первой фазы репаративного процесса заключается в оптимизации воспалительной реакции, делая ее более интенсивной с первых часов, но ограничивая продолжительность этой стадии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран. / Ефименко Н.А. [и др.] // Военно-медицинский журнал. 2002, №1, с. 48-52.
2. Петрова М.Б., Шестакова В.Г., Харитоновна Е.А., Павлова Н.В., Курбатова Л.А. Оценка эффективности электропунктуры при заживлении полнослойного дефекта кожи с помощью электронной микроскопии. Международная конференция



«Теоретические и практические инновации в науке» 28.04.- 30.04 2012. Гданьск – С. 14-18.

3. Егорова В. Н., Смирнов М. Н. Новые возможности иммунотерапии с использованием Ронколейкина® - рекомбинантного интерлейкина-2 человека // Terra Medica/ - 1999. - № 2. – С.15

4. Хомулло Г.В., Петрова М.Б., Павлова Н.В., Шестакова В.Г. Морфофункциональные аспекты заживления ран кожи в условиях стимуляции // Морфология. 1996. - № 2. - С. 101.

5. Хомулло Г.В., Петрова М.Б., Павлова Н.В., Харитонов Е.А. Особенности течения фазы воспаления репаративного процесса в коже на фоне периостита в условиях лазеротерапии // Верхневолжский медицинский журнал. 2006. - № 1. - С. 71.

6. Иванов А.Г., Мирзоева В.М., Кузнецова А.А., Михайлова Н.Д., Аксенова Е.Д. Юбилейная дата: 50 лет обучения иностранных учащихся в тверской государственной медицинской академии // Верхневолжский медицинский журнал. 2013. - Т. 11. - № 3. - С. 47-48.

7. Килейников Д.В., Орлов Ю.А., Мазур В.В., Платонов Д.Ю., Мазур Е.С. Влияние заместительной терапии левотироксином на артериальную гипертензию и ремоделирование сердца у больных первичным гипотиреозом // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2011. - Т. 7. № 1. - С. 41-44.

8. Калинин М.Н., Волков В.С. О патоаутокинезе гиперлипопротеидемии и его клиническом значении // Верхневолжский медицинский журнал. 2012. - Т. 10. № 2. - С. 21-24.

9. Радьков О.В., Калинин М.Н., Раскوراتов Ю.В., Заварин В.В. Вариабельность сердечного ритма при гестозе в зависимости от полиморфизма -381Т/С гена мозгового натрийуретического пептида // Верхневолжский медицинский журнал. 2011. - Т. 9. № 1. - С. 13-16.

10. Петрова М.Б., Павлова Н.В., Харитонов Е.А. Морфологические особенности заживления ран кожи в условиях применения раствора I-цистеина-нитрата серебра // Морфология. 2010. - Т. 137. № 4. - С. 154.

11. Петрова М.Б., Хомулло Г.В. Изучение регенерации тканей на биологических моделях и в клинике // Верхневолжский медицинский журнал. 2011. - Т. 9. № 4. - С. 45-49.
12. Довгилева О.М., Хомулло Г.В., Петрова М.Б. Основные особенности репаративной регенерации кожи в условиях применения хитозана // Верхневолжский медицинский журнал. 2011. - Т. 9. № 3. - С. 30-37.
13. Мирзоева В.М., Михайлова Н.Д. принципы формирования коммуникативной структуры научного (медицинского) текста в аспекте анализа закономерностей его организации. Вестник Тверского государственного университета. Серия: Филология. 2013. - № 1. - С. 271-277.
14. Волков В.С., Макушева М.В., Килейников Д.В. Суточный профиль артериального давления у больных гипотиреозом // Клиническая медицина. 2007. - Т. 85. № 11. - С. 37-39.
15. Макушева М.В., Килейников Д.В. Результаты суточного мониторирования экг с оценкой вариабельности ритма сердца у больных первичным гипотиреозом с сопутствующей артериальной гипертонией // Верхневолжский медицинский журнал. 2008. - Т. 6. № 1. - С. 23-25.
16. Белякова Н.А., Курочкин Н.Н., Килейников Д.В., Лясникова М.Б. Результаты профилактики йодной недостаточности у детей г. Твери // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). 2002. - Т. 30. № 1. - С. 58-62.
17. Егорова Е.Н., Кузьмина М.И., Мазур В.В., Сергеева С.И., Калинин М.Н., Мазур Е.С. Маркеры системного воспаления и микробиоценоз толстого кишечника при хронической сердечной недостаточности // Верхневолжский медицинский журнал. 2011. - Т. 9. № 1. - С. 3-7.
18. Егорова Е.Н., Калинин М.Н., Мазур Е.С. Системное воспаление в патогенезе хронической сердечной недостаточности // Верхневолжский медицинский журнал. 2012. - Т. 10. № 1. - С. 16-19.
19. Пустовалова Р.А., Петрова М.Б. Действие цитокинов на процесс заживления ран кожи // Верхневолжский медицинский журнал. 2008. - Т. 6. № 3. - С. 20-22.
20. Баженов Д.В., Иванов А.Г., Мирзоева В.М. Психолого-педагогические факторы успешности подготовки иностранных учащихся в медицинском вузе // Высшее образование в России. 2011. - № 11. - С. 70-75.

21. Мирзоева В.М., Кузнецова А.А. К вопросу важности формирования ключевых компетенций для подготовки специалиста в сфере медицины // Тверской медицинский журнал. 2014. - № 2. - С. 89-95.
22. Голычев В.Н., Попов П.Н., Торопыгин С.Г., Килейников Д.В. К вопросу о совершенствовании компьютерного экзамена на кафедре глазных болезней ТГМА // Верхневолжский медицинский журнал. 2010. - Т. 8. № 1. - С. 42-44.
23. Килейников Д.В. Современные образовательные технологии в тверской государственной медицинской академии // Верхневолжский медицинский журнал. 2011. - Т. 9. № 4. - С. 15-18.
24. Радьков О.В., Калинин М.Н., Заварин В.В. Влияние полиморфизма генов цитокинов на формирование дисфункции эндотелия при гестозе // Цитокины и воспаление. 2010. - Т. 9. № 3. - С. 15-18.
25. Аникин В.В., Калинин М.И., Вороная Ю.Л. Показатели иммунной системы у больных с нарушениями сердечного ритма // Российский кардиологический журнал. 2001. - № 6. - С. 31.