

БЛАГОТВОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДИГИДРОКВЕРЦИТИНА НА ПРОЦЕСС РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ ПОСЛЕ ТЕРМИЧЕСКОГО ОЖОГА

© А. А. Наумов,¹ М. М. Поцелуева^{1, 2, *}

¹Пуцунский государственный университет и ²Сектор функциональной биохимии, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцунь;

* электронный адрес: mpotseleva@rambler.ru

Установлено, что флавоноид растительного происхождения дигидрокверцетин, локализованный в наночастицы лецитина в присутствии аминокислоты, способствует снижению воспалительных реакций после термического ожога в раневой области. Использование липосомального комплекса при ожоговой травме стабилизирует эндогенную антиоксидантную систему и ограничивает зону вторичного некроза в ранах. При этом отмечены интенсификация процесса регенерации кожных покровов и репарация волосяных фолликулов и сальных желез.

Ключевые слова: антиоксиданты, окислительный стресс, термический ожог, структура кожи, регенерация.

Известно, что многие патологические состояния, в том числе и ожоговая травма, сопровождаются развитием дисбаланса между интенсивностью свободнорадикальных процессов и функциональной активностью антиоксидантной системы (Aguoma, 1998; Halliwell, Gutteridge, 1990; Поцелуева и др., 1999). В нормальном состоянии стимуляция свободнорадикального окисления липидов компенсируется адекватным повышением активности антиоксидантной системы (Scandalio, 1997). При ожоге происходят активация процесса перекисного окисления липидов и достаточно быстрое истощение антиоксидантного потенциала (Самойленко и др., 2000). В этих условиях для лечения целесообразно использовать антиоксидантные средства. Препарат, содержащий антиоксидант, должен иметь хороший контакт с поврежденной поверхностью, быть нетоксичным и как лекарственная форма иметь пролонгированное действие. В связи с этим целесообразно было использовать антиоксидант в липосомальной форме, который предотвращал бы реактивно-воспалительные явления, препятствовал бы перекисному окислению липидов и способствовал регенеративным процессам. В качестве такого препарата был выбран препарат «Фламена», содержащий природный флавоноид дигидрокверцетин (ДГК), имеющий пять гидроксильных групп, благодаря которым он является высокоактивным антиоксидантом, локализованным в фосфолипидном контейнере в присутствии глицина.

Цель данной работы состояла в исследовании эффективности местного лечения ран у животных после термического ожога кожи с помощью липосомальной формы ДГК. В качестве критериев эффективности действия препарата были выбраны планиметрические, биохимические и гистологические исследования.

Материал и методика

Для экспериментов по изучению влияния препарата «Фламена» на процесс лечения раны после термического ожога использовали крыс-самцов линии Вистар массой 220—250 г, с которыми работали в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были распределены на две группы: 1-я — термический ожог (контрольная группа), 2-я — термический ожог (подопытная группа) с ежедневным 4-разовым смазыванием поверхности раны препаратом «Фламена».

В процессе подготовки к эксперименту с кожи животного в верхней лопаточной области спины был удален волосяной покров с помощью бритвы и депилятора. Термический ожог кожи осуществляли металлическим стержнем диаметром 1 см², нагретым до 110 ± 5 °С, в течение 1 мин. В результате термического воздействия животным был получен ожог второй степени.

Составными компонентами липосомального препарата «Фламена» является природный флавоноид ДГК, концентрация которого в готовом препарате составляет 4 мг на 1 мл липосом. В состав препарата входит мембранообразующий фосфолипид (МФЛ) — 10%-ный лецитин и 5%-ный раствор аминокислоты глицина в 0.1%-ном водно-спиртовом растворе. Размер липосом, полученных методом пограничного раздела фаз, составляет от 20 до 300 нм.

Контроль течения раневого процесса производили на основании объективных критериев: планиметрического метода оценки изменения площади раневого дефекта и динамического морфологического анализа продольных гистологических срезов кожи раневого и околораневого пространства у экспериментальных и контрольных животных. Образцы кожи животного (раневого и околоране-

вого пространства) для проведения гистологических исследований фиксировали 10%-ным формалином. Затем срезы кожи толщиной 5—7 мкм подвергали стандартной схеме приготовления гистологических препаратов с окрашиванием гематоксилин-эозином по Эрлиху, выявляющим мембранные структуры и цитоплазму клетки (Семченко и др., 2006). Анализ гистологических срезов проводили на микроскопе Axiovert 200 (Германия). Относительную скорость эпителизации ожоговых ран оценивали планиметрическим методом. Измерения проводили каждые сутки. При повторных исследованиях определяли площадь раны и устанавливали долю уменьшения ее за 1 сут по отношению к площади, вычисленной при предыдущем измерении по следующей формуле:

$$Sp = (S - S_n) \cdot 100/St,$$

где Sp — площадь застания раны за 1 сут (в %), S — площадь раны при предыдущем измерении, S_n — площадь раны при данном измерении, t — число суток между измерениями.

Плазму крови получали методом дифференциального центрифугирования при 500 об/мин в течение 10 мин и последующим центрифугированием при 12 000 об/мин в течение 10 мин.

Определение концентрации антиоксидантов в плазме крови после термического ожога проводили по стандартным методикам. Количественное определение SH-групп в низкомолекулярных и высокополимерных соединениях (белкового и небелкового происхождения) определяли спектрофотометрическим методом по изменению уровня продуктов, окрашиваемых 5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) (Соколовский и др., 1997; Карпищенко, 1999). Для этого 100 мкл плазмы крови помещали в раствор, содержащий 875 мкл 0.1 М буферного раствора Трис-НСI (рН 8.0), с добавлением 25 мкл 0.4%-ного раствора ДТНБ в этаноле с последующим измерением оптической плотности при 412 нм. Расчет концентраций осуществляли по калибровочной кривой с использованием стандартных растворов восстановленного глутатиона. Для определения содержания тиолов небелкового происхождения образец плазмы крови смешивали в соотношении 1 : 3 с 20%-ным раствором сульфосалициловой кислоты, пробы перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, а затем определяли концентрацию SH-групп в супернатанте по вышеописанной методике.

Содержание мочевой кислоты в плазме крови определяли с помощью уриказного метода (Меньшиков, 1987).

Для определения содержания α -токоферола была проведена его экстракция из плазмы крови с помощью гептана и проведен спектрофотометрический анализ (Архипова, 1988; Esterbauer et al., 1989).

Результаты и обсуждение

При ожоговой травме в зоне поражения наблюдаются первичные анатомические и функциональные изменения, реактивно-воспалительные явления и регенеративные процессы. На рис. 1 представлено состояние раны после термического ожога кожи при $110 \pm 5^\circ\text{C}$ в контроле (*а* — сразу после ожога, *б* — через 72 ч и в эксперименте с применением липосомальной формы антиоксиданта ДГК — препарата «Фламена» (*в* — после ожога, *г* — через 72 ч). Из данного рисунка видно, что в контрольной группе об-

ласть термического поражения имеет четкие границы, заметно начало формирования ожогового пузыря, на коже вокруг раны наблюдается значительное покраснение. С течением времени (рис. 1, *б*) наблюдается увеличение травмированной поверхности в 1.2—1.3 раза с признаками воспаления и некроза. В экспериментальной же группе (рис. 1, *в, г*) расширения поврежденной поверхности с течением времени, увеличения паранекротической области не происходило. Отмечено формирование раневого струпа ровной формы, под его поверхностью наблюдалось равномерное заживление, признаков воспаления не обнаружено, площадь ожоговой области через 3 суток была уменьшена на $15 \pm 3\%$.

Для детального исследования действия препарата «Фламена» были сделаны гистологические срезы кожи через различные интервалы времени после термического ожога (рис. 2). На рис. 2, *а* представлен гистологический срез кожи через 5 сут после термического ожога в контрольной группе животных, где четко наблюдаются разрушение эпидермиса и деструктивные процессы в дерме. При обработке раны препаратом «Фламена» (рис. 2, *г*) под остатками некротической ткани хорошо виден разрушенный участок эпидермиса, а рядом прилегает участок с признаками регенерации, видны все составляющие его слои. Под эпидермисом в дермальном слое видны хаотически расположенные фибробластоподобные клетки. Наблюдается увеличение количества пролиферирующих клеток как в базальном слое эпидермиса, так и на незначительном удалении от границ повреждения в сосочковом и сетчатом слоях дермы. Через 10 сут в контрольной группе (рис. 2, *б*) продолжают наблюдаться деструктивные участки кожи в районе термического ожога: разрушен эпидермис, повреждены волосные фолликулы, сальные железы и прилежащие соединительные ткани. В экспериментальной же группе после регулярной обработки раны препаратом «Фламена» (рис. 2, *д, е*) через 10 и 15 сут после ожога четко видна демаркационная линия между разрушенными и регенерирующими слоями, отмечена активация клеток базального слоя. В дермальном слое четко видны клетки в разных фазах митоза. На рис. 3 представлены гистологические срезы поверхности кожи через 5, 10 и 15 дней после термического ожога, где можно оценить состояние волосных фолликулов и сальных желез. В контрольной группе (рис. 3, *а—в*) наблюдаются разрушение эпидермиса и скопление недифференцированных клеток, что указывает на деструктивные процессы в этой зоне. Через 15 сут после ожога отмечены деградация волосных фолликулов и нарушение строения подлежащих слоев дермы. В экспериментальной же группе при обработке места ожога препаратом «Фламена» (рис. 3, *г—е*) в области регенерирующего эпидермиса отмечено формирование новых волосных фолликулов (рис. 3, *г, д*), значительно лучше сохранена и способна к восстановлению структура сальных желез (рис. 3, *е*). Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что «Фламена» оказалась эффективным препаратом для местного лечения ран после термического ожога. Данная лекарственная форма позволила уменьшить влияние факторов, способствующих углублению некроза, развитию ишемии тканей, инфицированию ран. Все это создало оптимальные условия для процесса регенерации тканей. Положительный эффект действия «Фламена» обусловлен оптимальным композиционным составом препарата. Дигидрокверцетин, основной компонент препарата, являясь высокоэффективным антиоксидантом, способен связывать свободные радика-

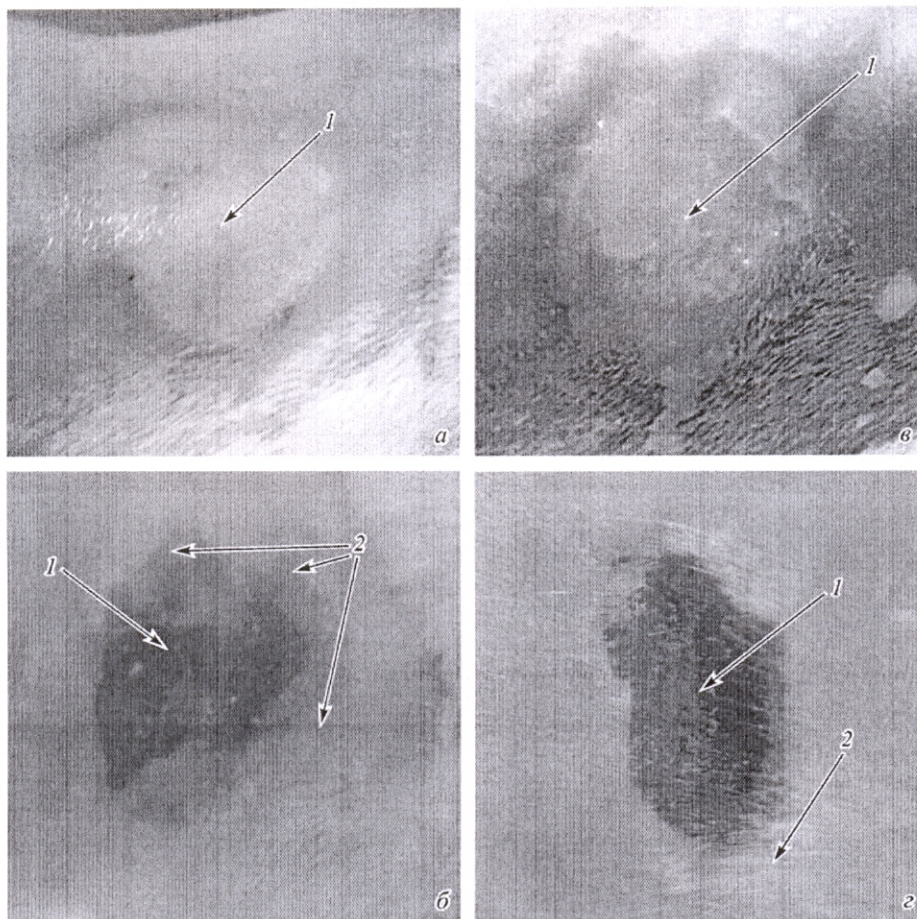


Рис. 1. Состояние раны после термического ожога в контроле (а, б) и в эксперименте (в, г) после обработки препаратом «Фламена» через различные интервалы времени.

а — состояние раны контрольного животного сразу после ожога: 1 — центр раны, $S = 1.16 \text{ см}^2$; б — состояние раны контрольного животного через 72 ч: 1 — зона воспаления, 2 — зона паранекроза, $S = 1.5 \text{ см}^2$; в — состояние сразу после ожога у экспериментального животного: 1 — центр раны, $S = 1.32 \text{ см}^2$; г — состояние раны через 72 ч после обработки препаратом (4 раза в сутки) «Фламена»: 1 — центр раны, 2 — восстановленный волосистой кожей, $S = 1.05 \text{ см}^2$.

лы, предохранять от перекисного окисления липиды. Использование антиоксиданта при ожоге стабилизирует эндогенную антиоксидантную систему, что тормозит развитие свободнорадикального перекисного окисления липидов биомембран и других клеточных структур, ограничивает зону вторичного некроза в ранах. Кроме того, данный препарат показал свои противовоспалительные свойства, которые проявились в отсутствии нагноения раны и в минимизации поврежденной поверхности. Практически отсутствие воспалительной реакции после ожогов может быть обусловлено способностью флавоноидов

в присутствии металлов переменной валентности образовывать комплексы, в частности с железом, которые помимо антиоксидантных свойств могут проявлять и прооксидантную активность (Sugihara et al., 1999), предотвращая тем самым бактериальное развитие на поверхности раны. Другой причиной снижения воспалительной реакции может быть падение секреции гистамина тучными клетками (Bronner, Landry, 1985) в присутствии ДГК.

Патологические процессы, протекающие при ожогах, сопровождаются значительными нарушениями в структурно-функциональных свойствах биомембран, а антиок-

Влияние липосомального наноконплекса «Фламена» на уровень антиоксидантов в плазме крови крыс через 15 сут после термического ожога

Вариант опыта	Эндогенные антиоксиданты, мкМ, $\bar{X}_{cp} \pm S_{\bar{X}_{cp}}$			
	мочевая кислота	α -токоферол	низкомолекулярные SH-группы	SH-группы белков
Здоровые животные	52.8 ± 9	10.9 ± 0.8	2.4 ± 0.6	35 ± 7
Термический ожог (контроль)	34.7 ± 7	8.6 ± 0.65	2.0 ± 0.8	26 ± 5
Термический ожог + «Фламена»	48.1 ± 8	10.3 ± 0.7	2.3 ± 0.9	30 ± 7

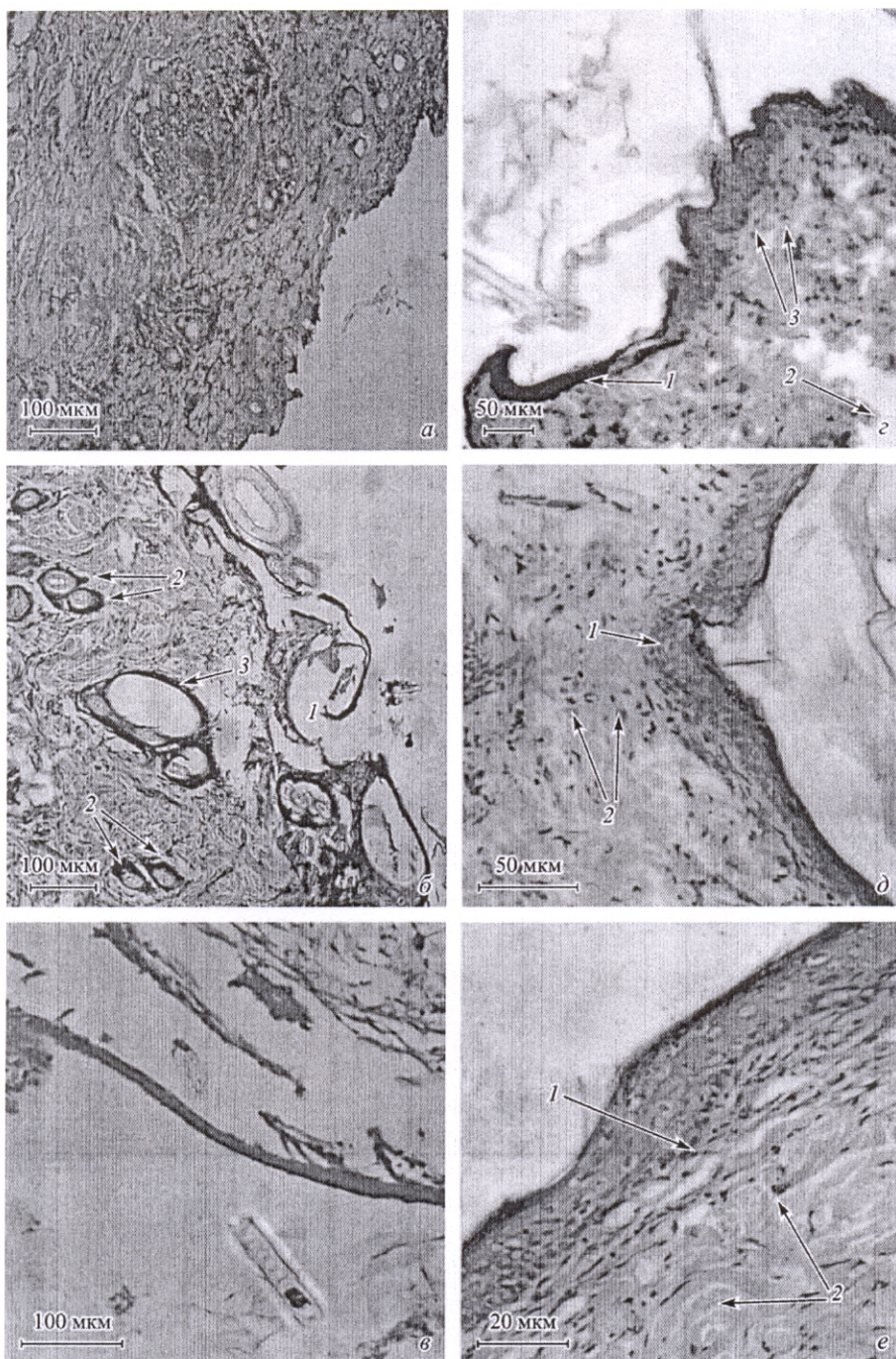


Рис. 2. Динамика регенерации кожи в области термического ожога лопаточной зоны крысы через 5, 11 и 15 сут в контроле (а—в) и в опыте (г—е) с применением препарата «Фламена».

а — разрушенный эпидермис через 5 сут после ожога и деструктивный процесс в дерме; б — разрушены эпидермис (1), волосяные фолликулы (2), сальные железы (3) и прилегающие соединительные ткани; в — потерявший клеточное строение участок эпидермиса через 15 сут после ожога; г — разрушенный участок эпидермиса (1), участки дермы с разрушенной структурой (2), фибробластоподобные клетки (3); д — клетки базального слоя (1), островки клеток в разных фазах митоза (2); е — хорошо оформленный эпидермис и размножение клеток в базальном слое (1), волокна соединительной ткани (2). Окраска гематоксилин-эозином.

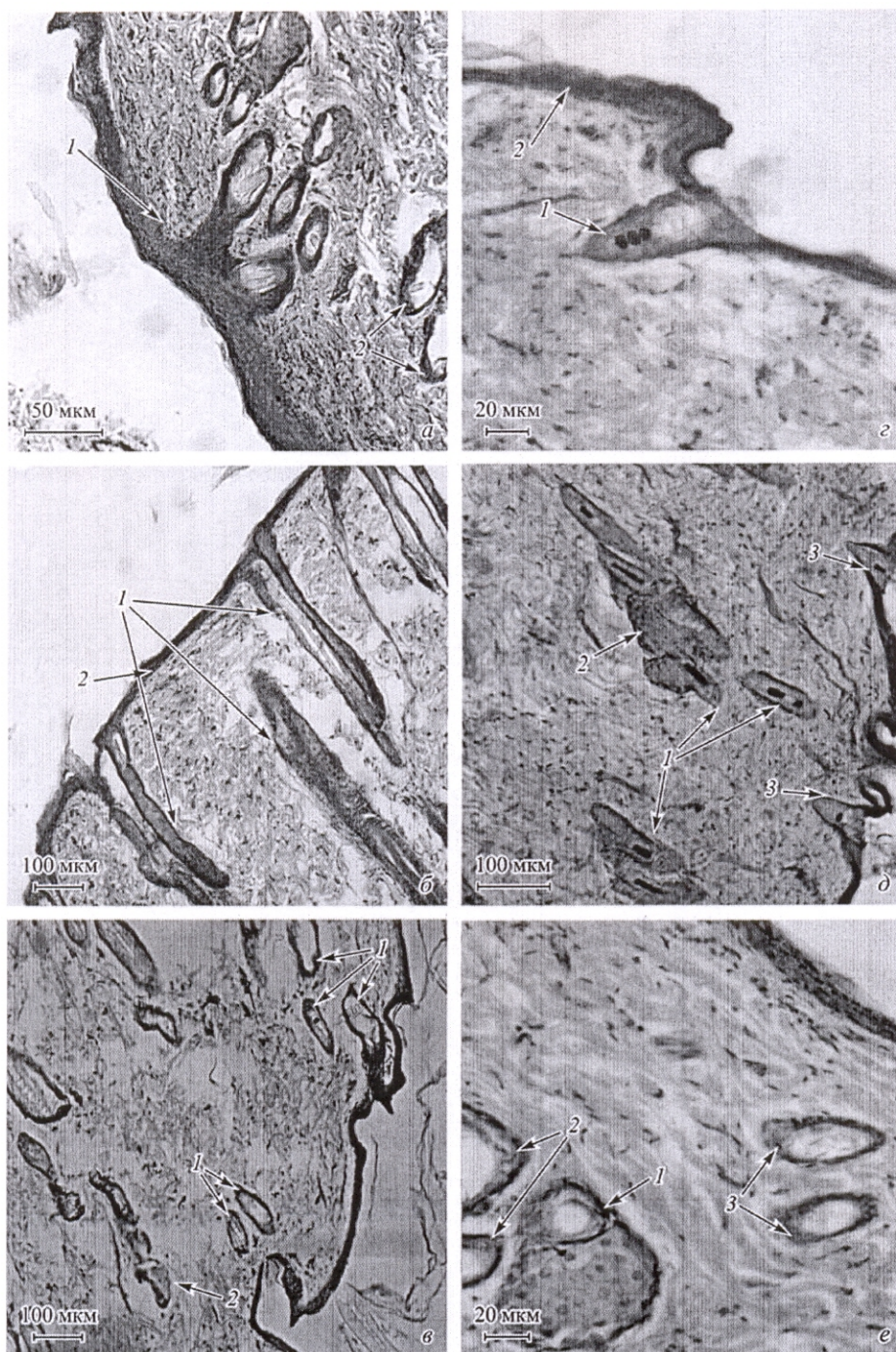


Рис. 3. Динамика формирования волосяных фолликулов в процессе регенерации кожных покровов через 5, 11 и 15 сут после термического ожога под действием препарата «Фламена».

a—в — контрольная группа животных; *г—е* — экспериментальная группа. *a* — разрушение эпидермиса (1), разрушение волосяных фолликулов и скопление недифференцированных клеток (2); *б* — дегенерация волосяных фолликулов (1), деструкция эпидермиса (2), нарушение строения подлежащих слоев дермы; *в* — деструкция в поверхностном слое и в структуре волосяных фолликулов (1) и салыных желез (2); *г* — формирование волосяного фолликула (1), область регенерирующего эпидермиса (2); *д* — группа волосяных фолликулов (1), салыная железа (2), выход волос на поверхность кожи (3); *е* — салыная железа (1), клетки концевых отделов салыной железы, способные к клеточному делению (2), участки волосяных фолликулов (3). Окраска гематоксилин-эозином.

сиданты могут способствовать улучшению упругомеханических и функциональных свойств различных клеток. В этой связи была изучена динамика антиоксидантной емкости плазмы крови после термического ожога. Как показано в таблице, липосомальная форма ДГК поддерживает уровень белковых и низкомолекулярных SH-групп, уровень α -токоферола и мочевой кислоты практически на нормальном уровне. Способность данного наноконплекса стабилизировать уровень эндогенных антиоксидантов плазмы предотвращает развитие окислительного стресса, снижая тем самым его пагубные последствия.

Композиционный состав липосомального препарата «Фламена» помимо высокоактивного антиоксиданта дигидрокверцетина включает в себя глицин, который может поддерживать дыхательную функцию митохондрий, тормозить процесс апоптоза в поврежденных клетках (Тоньшин и др., 2007), а также способствовать восстановлению клеточных мембран в результате присутствия лецитина в его составе. Все компоненты препарата «Фламена» нормализуют и поддерживают состояние тканевого гомеостаза и соответственно, как показали эксперименты, способствуют интенсивной регенерации кожных покровов с восстановлением дериватов кожи после химического (Наумов и др., 2009) и термического ожогов второй степени.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по образованию (проект 1.4.08) и Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (проекты 2.1.1/6663 и 2.1.1/6872).

Список литературы

- Архипова О. Г. 1988. Методы исследований в профпатологии. М.: Мир, 207 с.
 Карпищенко А. И. 1999. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб.: Интермедика, 2 : 72—73.
 Меньшиков В. В. 1987. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Наука. 221 с.
 Наумов А. А., Шаталин Ю. В., Сухомлин Т. К., Поцелуева М. М. 2009. Влияние липосом, содержащих антиоксидант, фосфолипид и аминокислоту на процесс регенерации кожи по-

сле химического ожога. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 96—102.

Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Алабин В. С., Евтодченко Ю. В. 1999. Генерация реактивных форм кислорода полиморфоядерными лейкоцитами в процессе развития гепатомы в брюшной полости животных. Цитология. 41 (2) : 162—166.

Самойленко Г. Е., Фисталь Э. Я., Солошенко В. В., Фисталь Н. Н. 2000. Влияние раннего хирургического иссечения некроза на адаптационные и патологические реакции при глубоких ожогах. Арх. клин. эксперим. мед. 9 (1) : 256—259.

Семченко В. В., Баращикова С. А., Ноздрин В. И., Артемьев В. Н. 2006. Гистологическая техника. Омск: Омск-Орел. 279 с.

Соловский В. В., Кузьмина В. С., Москадынова Г. А., Петрова Н. Н. 1997. Спектрофотометрическое определение тиолов в сыворотке крови. Клин. лабор. диагностика. 11: 20—21.

Тоньшин А. А., Лобышева Н. В., Язугинский Л. С., Безгина Е. Н., Мошков Д. А., Нарциссов Я. Р. 2007. Влияние тормозного нейромедиатора глицина на медленные деструктивные процессы в срезах коры больших полушарий головного мозга при аноксии. Биохимия. 72 (5) : 622—630.

Aruoma O. I. 1998. Free radicals, oxidants and antioxidants: trend towards the year 2000 and beyond. In: Molecular biology of free radicals in human disease. London: Oica International, Saint Lucia. 1—28.

Bronner C., Landry Y. 1985. Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. Agents Actions. 16 : 147—151.

Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Oberreither S., Rothenecker M., el-Saadani M., Jürgens G. 1989. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 570 : 254—267.

Halliwell B., Gutteridge J. M. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys. 280 : 1—8.

Scandalios J. G. 1997. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. Free Radic. Biol. Med. 23 : 471—472.

Sugihara N., Arakawa T., Ohnishi M., Furuno K. 1999. Anti- and pro-oxidative effect of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. Free Radic. Biol. Med. 27 : 1313—1323.

Поступила 3 VIII 2009

BENEFICIAL ACTION OF THE LIPOSOMAL FORM OF DIHYDROQUERCETIN ON THE PROCESS OF SKIN REGENERATION AFTER THERMAL BURN

A. A. Naumov,¹ M. M. Potselueva^{1,2,*}

¹ Pushchino State University and ² Sector of Functional Biochemistry, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino;

* mail: mpotselueva@rambler.ru

It was found that the flavonoid of plant origin, dihydroquercetin, being localized in lecitin nanoparticles in the presence of amino acid, reduced inflammatory reactions in the wound zone after thermal burn. Application of the liposomal complex on burn trauma stabilized the endogenous antioxidant system and minimized the area of the secondary necrosis in burn wound. Also, intensification of skin regeneration and repair if hair follicles and sebaceous glands were observed.

Key words: antioxidants, oxidative stress, thermal burn, skin structure, regeneration.