



УДК 582.757

РЕПАРАЦИЯ КОЖНОЙ РАНЫ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКСТРАКТА МОЛОЧАЯ ФИШЕРА

Е.В. Фефелова¹, Е.М. Кривошеева²

¹ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения РФ
Чита, Россия

²ФГБОУ ВО «Забайкальский государственный университет»
Министерства образования и науки РФ
Чита, Россия

Аннотация. Показано, что наблюдается усиленный рост фибробластов при добавлении в культуральную среду гомоцистеина в концентрациях от 6,3 до 25 мкмоль/л. При уровне гомоцистеина 50 мкмоль/л основная масса клеток погибает. Зарегистрировано дозависимое увеличение уровней малонового диальдегида и белков теплового шока 70 и 90, увеличивается концентрация IL-1 β , IL-6, IL-4 и снижается IL-10. При изучении влияния экстракта молочая Фишера на репарацию кожной раны у мышей выявлено, что исследуемый экстракт стимулирует процессы заживления. В условиях гипергомоцистеинемии эффективность экстракта молочая остается высокой.

Ключевые слова: культура фибробластов, гомоцистеин, экстракт молочая Фишера, ромазулан, репарация.

Одной из самых актуальных и сложных проблем в хирургии является лечение ран. Послеоперационные гнойные осложнения развиваются у 30% пациентов [1]. Серьезное влияние на течение раневого процесса оказывают изменение микрофлоры раны и реактивность организма [2]. Перспективным направлением в лечении является поиск препаратов, обладающих антисептическим действием, благотворно влияющих на местный иммунитет, ускоряющих заживление [3; 4]. Молочай Фишера (*Euphorbia Fischeriana*, *Euphorbia Pallasii tures L.*) давно и с успехом применяется в народной медицине. В тибетской медицине порошком корня молочая Фишера лечат ожого-

вые раны, трофические язвы и фурункулы [5]. В научной медицинской литературе нами не найдены данные об использовании экстракта корней молочая Фишера при лечении ран. Известно, что повышенный уровень гомоцистеина (ГЦ) является триггером разнообразной патологии [6; 7]. Влияние же ГЦ на процессы репарации изучено недостаточно.

Целью нашей работы явилось изучение влияния экстракта молочая Фишера (ЭМФ) на раневой процесс в условиях гипергомоцистеинемии.

Материалы и методы. Эксперимент поставлен на 80 белых лабораторных мышках-самцах средней массой 26 грамм. Мыши содержались

в стандартных условиях вивария. Эксперимент проводили в соответствии с требованиями «Международных рекомендаций по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», принятыми Международным советом медицинских научных обществ (СИУВС) в 1985 г. Животные были разделены поровну на 8 групп (по 10 мышей в каждой группе): 1-я — интактные мыши (контроль I), 2-я — животные, у которых рана находилась под асептической повязкой (контроль II), 3-я — мыши со сформированным состоянием ГГЦ (контроль III), 4-я — с раной, повязка на которой содержала ромазулан, 5-я — с раной, леченой повязкой с ЭМФ, 6-я — животные с ГГЦ с раной, покрытой асептической повязкой, 7-я — мыши с ГГЦ, у которых при лечении раны использовался ромазулан, 8-я — животные с ГГЦ с повязкой на рану, содержащей ЭМФ.

Рану формировали путем иссечения кусочка кожи в области задней поверхности шеи с помощью ножниц и скальпеля по разметке шаблона в виде круга площадью 45 мм под фторотановым наркозом. На 1-е, 5-е и 10-е сутки измеряли ее площадь и рассчитывали величину относительного заживления по методу А.Б. Шнайдера [8]. Модель гипергомоцистеинемии формировали внутрибрюшинным введением гомоцистеина в дозе 0,001 мг на 1 мл ОЦК в течение 10 дней. Уровень гомоцистеина определяли методом ВЭЖХ.

Исследование влияния гомоцистеина *in vitro* на функциональную активность фибробластов проводилось на культуре полученных из биоптата тканей эмбриона. Засевали 96-луночные плоскодонные планшеты для культивирования с концентрацией 20 000 клеток на 1 см², добавляли по 50 мкл раствора ГЦ, разведенного в среде, в дозах от 3,5 мкг/мл до 100 мг/мл и культивировали в течение суток в CO₂-инкубаторе «Sanyo» (Япония) при 37 °С, 5% CO₂ и 95% влажности. Интенсивность перекисного окисления липидов определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) по методу Л.И. Андреевой с соавт. (1988). Уровни интерлейкинов (IL) и белков теплового шока (HSP) определяли в среде роста иммунофермент-

ным способом с диагностическими наборами производства ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Россия).

Экстракт из корня молочая Фишера готовили методом трехэтапной спиртово-хлороформной экстракции с предварительной очисткой сырья от смол, обладающих токсическим раздражающим действием [9]. Ромазулан разводили согласно инструкции.

Полученные данные обработаны методами непараметрической статистики в программе Statistica for Windows v. 6,0 (StatSoft, USA, 1999). Описательная статистика проводилась с помощью медианы, 25 и 75 перцентилей. Значимость изменений сравниваемых показателей анализировалась с помощью критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Визуальное наблюдение культуры клеток в нашем эксперименте позволило выявить отчетливые различия роста фибробластов с добавлением различных доз ГЦ в среду роста. В контрольных лунках фибробласты были распластаны по дну флакона, каждая клетка имела от 2 до 4 отростков, которые анастомозировали с отростками соседних клеток. Цитолемма и кариолемма их четко контурировала, цитоплазма была гомогенная, центрально расположенные ядра пузырьковидные, округлой формы, имели гладкую тонкую оболочку и содержали 1—2 крупных ядрышка. В опытных образцах, содержащих 12,5 и 25,0 мкмоль/л ГЦ форма фибробластов веретеновидная, тела клеток плотно прилежали друг к другу, поэтому анастомозы между клетками прослеживались плохо. В культурах с концентрацией ГЦ 50 мкмоль/л отмечалось уменьшение размеров фибробластов и количества отростков, наблюдалось сморщивание клеток и сглаживание контуров их ядер, определялись фрагменты разрушенных клеток. При изучении культуральной среды, оказалось, что признаки повреждения фибробластов — дозозависимое увеличение концентраций малонового диальдегида и содержание HSP 70 и 90α наблюдаются уже при введении самой низкой дозы гомоцистеина (табл. 1).

Таблица 1

Содержание малонового диальдегида и белков теплового шока в культуральной среде фибробластов (Ме (25-й; 75-й))

| Показатели | Контроль | 6,3 мкмоль/г ГЦ | 12,5 мкмоль/л ГЦ | 25,0 мкмоль/л ГЦ | 50,0 мкмоль/л ГЦ |
|-----------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| МДА мкмоль/мг липидов | 0,07 [0,03; 0,09] | 0,11 [0,05; 0,27] | 1,9 [1,80; 2,50] *# | 2,2 [1,85; 2,75]*# | 0,35 [0,35 0,80]*#●Δ |
| HSP70, нг/мл | 0,12 [0,10; 0,13] | 0,21 [0,16; 0,29]* | 0,34 [0,29; 0,36] *# | 0,38 [0,35; 0,43] *#● | 0,49 [0,49; 0,54] *#●Δ |
| HSP90a, нг/мл | 0,13 [0,10; 0,15] | 0,23 [0,21; 0,24] * | 0,24 [0,23 0,27] * | 0,57 [0,42; 0,72] *#● | 0,19 [0,14; 0,31] *Δ |

Примечание: * — уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой, # — по сравнению с добавлением гомоцистеина в среду в концентрации 6,3 мкмоль/л, ● — 12,5, Δ — 25,0.

Увеличение концентрации белков теплового шока является проявлением механизмов адаптации клетки к окислительному стрессу, вызванному гомоцистеином. Это, в свою очередь, привело к изменению функции клеток, что проявилось различной динамикой синтеза интерлейкинов. Наиболее выраженные изменения наблюдались в среде, содержащей 25 мкмоль/л гомоцистеина (за исключением ИЛ 10). Так, содержание ИЛ 1b увеличилось более чем в 70 раз (p = 0,003), ИЛ 4 — в 7 раз (p = 0,003). Максимальное увеличение ИЛ 6 получено при концентрации гомоцистеина в 50 мкмоль/л — в 17 раз (p = 0,003). Регистрировалось дозозависимое снижение концентрации ИЛ 10. При концентрации гомоцистеина 6,3 мкмоль/л — в 1,7 раза (0,003), 12,5 и 25 мкмоль/л — в 7 раз (p = 0,003 и 0,004 соответственно), 50 мкмоль/л — в 246 раз (p = 0,003). Полученные нами данные свидетельствуют о прогрессировании и хронизации процессов воспаления, вызванных гомоцистеином.

В ходе эксперимента *in vivo* получены следующие результаты. Уровень гомоцистеина у интактных животных составил в среднем 4,46 мкмоль/л. При моделировании ГГЦ на 5-е сутки уровень гомоцистеина поднялся до 28,0 ± 1,2 мкмоль/л, а к 10-м суткам достиг 39,1 ± 1,34 мкмоль/л. ГГЦ резко замедляла процессы репарации раны, снижая скорость регенерации в 3 раза относительно показателей 2-й группы (p = 0,001).

При анализе площади раны выявлено, что на 5-е сутки площадь раны, леченой ЭМФ (5 груп-

па), уменьшилась на 28,6%, леченой ромазуланом (4 группа) — на 13,5%. На 10 сутки с ЭМФ — на 49%, с ромазуланом — на 31% (p < 0,001). В условиях ГГЦ на 5-е сутки площадь раны, леченой ЭМФ (8 группа) уменьшилась на 31,6%, ромазуланом (7 группа) — на 12%. На 10 сутки она сократилась у мышей 8 группы на 45%, в 7 группе только на 6% (p < 0,001). Величина относительного заживления раны подтвердила полученные результаты (рис.).

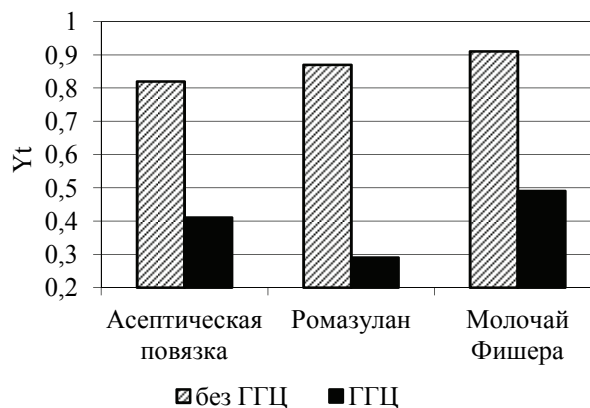


Рис. 1. Изменение величины относительного заживления кожной раны у мышей при использовании различных повязок

При этом действие ЭМФ в 2 раза ускорило процессы репарации на 5-е сутки течения раневого процесса, на 10-е сутки его действие также превосходило эффект ромазулана на 58%. В условиях ГГЦ эффективность ЭМФ возрастала. Так, на 5-е сутки эффект ЭМФ превышал действие

ромазулана в 2,6 раза, а на 10-е сутки — в 7,5 раз. В условиях ГГЦ ромазулан практически не влиял на скорость заживления раны, в то время как влияние ЭМФ наиболее выражено — в условиях ГГЦ он в три раза ускорял процессы репарации.

Данные, полученные в ходе нашего эксперимента, свидетельствуют о хорошей стимуляции репаративных процессов при лечении раны экстрактом молочая Фишера. Гипергомоцистеинемия замедляет процессы заживления раны, что можно объяснить выраженным повреждением фибробластов, нарушением синтеза ими цитокинов, влияющих на процессы репарации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерюхин И.А., Гельфанд Б.Р., Шляпников С.А. Хирургические инфекции. СПб.: Питер, 2003. С. 21—30.
2. Степанов А.В. Механизмы корректирующего действия полипептидов из лимфоидной ткани при иммунодефицитных состояниях и воспалении. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Иркутск, 1995.
2. Кривошеева Е.М., Фефелова Е.В., Кохан С.Т. Спектр фармакологической активности растительных адаптогенов // Фундаментальные исследования. 2011. № 6. С. 85—88.

3. Кривошеева Е.М., Фефелова Е.В., Бородулина И.И., Сепп А.В. Противовоспалительный и репаративный эффект адаптогенов при экспериментальном парадонтите на фоне гипергомоцистеинемии // XIV МНК: Здоровье семьи — XXI век. Римини—Пермь, 2010. С. 237—238.

4. Убашеев И.О., Назаров-Рыгдылон И.О., Убашеев В.Э. Раны и их лечение в тибетской медицине. Новосибирск: Наука, 1990.

5. Цыбиков Н.Н., Цыбикова Н.Н. Роль гомоцистеина в патологии человека // Успехи современной биологии. 2007. № 5. С. 471—482.

6. Фефелова Е.В., Измestьев С.В., Сепп А.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н. Изменения структуры миокарда и сдвиги в периферической крови при экспериментальной гипергомоцистеинемии // Забайкальский медицинский вестник. 2014. № 2. С. 114—118.

7. Шнайдер А.Б. Влияние некоторых полисахаридных препаратов на скорость заживления ран кожи вторичным натяжением: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Минск, 1983.

8. Способ получения биологически активного экстракта из корня молочая Палласа. Патент на изобретение № 2404789. Зарег. 27.11.2010. Е.М. Кривошеева с соавт. (Ю.А. Белозерцев, С.Т. Кохан, Е.В. Номоконов, М.И. Сердцев).

THE INFLUENCE OF *EUPHORBIA FISHER* EXTRACT ON REPAIR OF SKIN WOUNDS IN THE HYPERHOMOCYSTEINEMIA

E.V. Fefelova¹, E.M. Krivosheeva²

¹FGBOU HE "Chita State Medical Academy" Russian Ministry of Health
Chita, Russia

²FGBOU HE "Trans-Baikal State University" of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation
Chita, Russia

Annotation. It is shown when added to the culture medium in homocysteine concentrations from 6.3 to 25 mol/L fibroblasts observed enhanced growth. When homocysteine level of 50 mmol/l bulk of the cells are killed. Registered dose-dependent increase in the levels of malondialdehyde and of heat shock proteins 70 and 90, increasing the concentration of IL-1 β , IL-6, IL-4 and decreases — IL-10. Extract *Euphorbia Fisher* stimulates healing of skin wounds in mice. In terms of hyperhomocysteinemia, Extract *Euphorbia Fisher* efficiency remains high, unlike romazulan.

Key words: culture of fibroblasts, homocysteine, *Euphorbia Fisher* extract, romazulan, repair.

REFERENCES

1. Erjuhin I.A., Gel'fand B.R., Shljapnikov S.A. Surgical infection. St.Petersburg, Peter, 2003, pp. 21—30.
2. Stepanov A.V. Vlijanie peptidov iz limfoidnoj tkani na immunitet i vospalenie: Avtoref. dis. dokt. med. nauk. Irkutsk, 1995.

3. Krivosheeva E.M., Fefelova E.V., Kohan S.T. The spectrum of pharmacological activity of herbal adaptogens. *Fundamental research*, 2011, no. 6, pp. 85—88.

4. Krivosheeva E.M., Fefelova E.V., Borodulina I.I., Sepp A.V. Anti-inflammatory and reparative effect of adaptogens in experimental periodontitis in the background hy-



perhomocysteinemia. *XIV MNCs: Family Health — XXI century*. Rimini-Perm, 2010. P. 237—238.

5. Ubasheev I.O., Nazarov-Rygdylon I.O., Ubasheev V.Je. Wounds and their treatment in Tibetan medicine. Nauka, Novosibirsk, 1990.

6. Tsybikov N.N., Tsybikova N.M. The role of homocysteine in human pathology. *Uspekhi sovremennoy biologii*, 2007, vol. 127, no. 5, pp. 471-482.

7. Fefelova E.V., Izmet'ev S.V., Sepp A.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N. The changes of myocardial structure and changes in the peripheral blood in ex-

perimental hyperhomocysteinemia. *Zabaikal'skii Medical Gazette*, 2014, no. 2, pp. 114—118.

8. Shnajder A.B. Influence of some polysaccharide preparations on the rate of healing of skin wounds by secondary intention: Author. dis. cand. honey. sciences. Minsk, 1983.

9. A method of producing biologically active extract from the root of milkweed Pallas. Patent for the invention № 2404789. eV. 27.11.2010. E.M. Krivosheeva et al. (Ju.A. Belozercev, S.T. Kohan, E.V. Nomokonov, M.I. Serdcev).